

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAÍNA CAPELLI PEIXOTO

IMUNOSSELEÇÃO DE MIMOTOPOS DE ANTICORPOS BOVINOS CONTRA
Cysticercus bovis – DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DIAGNÓSTICO
ANTE-MORTEM PARA CISTICERCOSE BOVINA

CURITIBA

2011

JANAÍNA CAPELLI PEIXOTO

IMUNOSSELEÇÃO DE MIMOTOPOS DE ANTICORPOS BOVINOS CONTRA
Cysticercus bovis – DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DIAGNÓSTICO
ANTE-MORTEM PARA CISTICERCOSE BOVINA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

Área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientadora: Prof^a Dra. Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Peixoto, Janaína Capelli

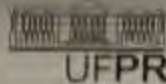
Imunosseleção de mimotopos de anticorpos bovinos contra *Cysticercus bovis* – desenvolvimento de um ensaio diagnóstico *ante-mortem* para cisticercose bovina. / Janaína Capelli Peixoto. – Curitiba, 2011.
122 p.: il.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol.

Coorientadora: Juliana Ferreira de Moura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Cisticercose. 2. *Cysticercus*. 3. Bovinos. 4. *Taenia*. I. Título. II. Thomaz-Soccol, Vanete, 1954-. III. Moura, Juliana Ferreira de, 1975-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Clínica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

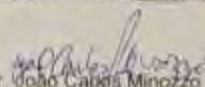
**"Imunosseleção de mimotopos de anticorpos bovinos contra
Cysticercus bovis – Desenvolvimento de um Ensaio Diagnóstico
Ante-Mortem para Cisticercose Bovina"**


por

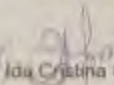
JANAÍNA CAPELLI PEIXOTO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof.ª Dr.ª Vanda Thomaz Socol (presidente)


Dr. João Carlos Minozzo


Prof. Dr. Luiz Felipe Caron


Prof.ª Dr.ª Ida Cristina Gubert (suplente)

Curitiba, 31 de janeiro de 2011

À minha família,
pela incondicional cumplicidade neste e em todos os projetos em que me envolvo.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, por tornar as coisas possíveis, por fechar portas e abrir janelas e por me sustentar nos momentos difíceis.

À minha mãe, pai e irmão, obrigada por TUDO e mais um pouco! Eu amo vocês!

Ao meu marido, obrigada por você ser assim: bem do jeitinho que você é. Eu amo você!

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e ao plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais – REUNI, pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Vanete Thomaz Soccol, pelo apoio, confiança, incentivo à pesquisa e para não desanimar e por não medir esforços para que este trabalho fosse desenvolvido.

À minha orientadora, ou mãe científica, Prof^a. Dra. Juliana Ferreira de Moura, pelas orientações, ensinamentos, idéias e discussões sobre este trabalho, atenção, dedicação, pelos puxões-de-orelha, por tanto, enfim. Obrigada por ser muito mais que uma boa orientadora, mas uma amiga de verdade.

À Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, pela orientação, carinho, disposição e objetividade de suas sugestões. Sua amizade, preocupação e sua presença constante foram muito importantes para mim! Obrigada por tornar o laboratório a nossa segunda casa e por mostrar que mais importante do que fazer algo bem-feito é fazer bem-feito e com prazer! Eu também vou sentir (muito) sua falta!

A Dra. J. K. Scott, pelas bibliotecas de fagos cedidas gentilmente.

Ao Prof^o. Dr. Alvimar Costa, da UNESP de Jaboticabal – SP pela concessão de soros de bovinos infectados e à Prof^a. Dra. Edilene Alcântara de Castro, pela seleção e separação de ovos de *Taenia* sp.

Ao Prof^o. Valmir Kowaleski Souza e ao Antônio Carlos Nunes pelo fornecimento de carne com cistos de *Cysticercus bovis*.

Ao Dr. João Carlos Minozzo, do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI da Secretaria de Estado da Saúde/PR, pelo fornecimento de

antígeno para os testes imunoenzimáticos e auxílio nas imunizações e ao Paulo Pereira de Castro por ser sempre tão prestativo.

À Prof^a. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz pela atenção e ajuda no seqüenciamento e a Elisabeth Cunha Penna de Moraes do Laboratório de Neurobiologia (Departamento de Patologia Básica – UFPR) pelo auxílio no criostato.

Ao Prof^o. Dr. Silvio Zanata, do Laboratório de Neurobiologia (Departamento de Patologia Básica – UFPR) e ao Prof^o. Dr. Carlos Ricardo Soccol, do Laboratório de Processos Biotecnológicos (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR) pelos equipamentos e inúmeros materiais emprestados.

Às doutorandas Silvana Maria Alban, do Laboratório de Imunoquímica (Departamento de Patologia Básica – UFPR) pela amizade, ensinamentos e orientações e Daniele Chaves, do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos (Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPR) pelo auxílio na imunofluorescência; e aos alunos de iniciação científica João Carlos Muzzi e Ronaldo Nakato, pelos testes ELISA realizados.

Aos membros da banca, Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, Prof^a. Dra. Ida Cristina Gubert, Dr. João Carlos Minozzo e Prof^o. Dr. Luís Felipe Caron, que tão gentilmente aceitaram ler esse trabalho e avaliá-lo.

E por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, principalmente aos amigos da UFPR: meus dias foram bem mais legais com vocês!

Muito obrigada!

♪ *Life is short, so make it what you wanna*

Make it good, don't wait until mañana ♪

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...

Martin Luther King

RESUMO

A cisticercose é uma importante doença parasitária provocada pelo desenvolvimento dos metacestodeos de *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) e de *Taenia solium* (*Cysticercus celulosae*) nos tecidos bovinos e suínos, respectivamente ou humanos. Além de causar prejuízos à pecuária de corte e ser considerada como um grande problema de saúde pública, ensaios diagnósticos sensíveis e precisos para detecção da parasitose no animal vivo e programas de vacinação permanecem como um desafio. Os objetivos deste estudo foram identificar, pela técnica de *Phage Display*, potenciais peptídeos ligantes a imunoglobulinas G de bovinos infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata*, na tentativa de encontrar um bom antígeno para ser usado na detecção *ante-mortem* da cisticercose bovina e avaliar se um peptídeo sintético também identificado por *Phage Display* seria capaz de proteger animais contra infecção experimental. No primeiro capítulo desta dissertação estão apresentados os resultados referentes à cisticercose bovina e mostram que fagos obtidos diferenciam soros positivos e negativos para a parasitose. No capítulo 2, estão apresentados os resultados da avaliação da proteção de NC-1 em camundongos infectados experimentalmente com *Taenia crassiceps*, e demonstram que a proteção foi de 74%. Conclui-se que o *Phage Display* é uma técnica capaz de identificar peptídeos de interesse e estes são capazes de proteger animais em programas de imunização experimental.

Palavras-chave: *Phage Display*. Cisticercose bovina. *Cysticercus bovis*. NC-1. *Taenia crassiceps*.

ABSTRACT

Cysticercosis is an important parasitic disease caused by developing metacestodes of *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and *Taenia solium* (*Cysticercus celulosae*) in bovine and swine tissues, respectively or human. Besides the economic losses to beef cattle and its impact on the public health system, sensible and accurate diagnostic methods for the detection of the etiological agents of cysticercosis in infected animals, as well as the implementation of vaccination programmes remain a challenge. Thus, the present study aims to identify, through the *Phage Display* technology, potential ligand peptides interacting with immunoglobulins G of bovines experimentally infected with *T. saginata* eggs, in an attempt to find effective antigens to be used in the *ante-mortem* detection of bovine cysticercosis and to evaluate if a synthetic peptide also identified by *Phage Display* is capable of protecting animals against experimental infections. In the first chapter of this dissertation, we present results referring to bovine cysticercosis and show that some phages obtained can differentiate positive and negative sera. In chapter 2 we evaluate the protection of NC-1 in mice experimentally infected with *T. crassiceps*. Of interest, this peptide showed a protection of 74%. We conclude that *Phage Display* technology is capable of identifying immunoprotective peptides which were effective in experimental immunization programmes.

Keywords: *Phage Display*. Bovine cysticercosis. *Cysticercus bovis*. NC-1. *Taenia crassiceps*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DO COMPLEXO TENIOSE/CISTICERCOSE.....	27
FIGURA 2 – TIPOS DE CORTE BOVINO.....	32
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO BACTERIÓFAGO FILAMENTOSO (A). P3, P6, P8, P9 E P7 REPRESENTAM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS (B).....	35
FIGURA 4 – DISPOSIÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS SOBRE A MEMBRANA.....	58
FIGURA 5 – PROCESSAMENTO DO <i>Cysticercus bovis</i> EM LABORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENO.....	60
FIGURA 6 – PERFIL PROTÉICO DOS DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Cysticercus bovis</i>	61
FIGURA 7 – PERFIL DE RECONHECIMENTO DOS ANTÍGENOS PELAS IGGS BOVINAS.....	62
FIGURA 8 – PERFIL DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE COELHO IMUNIZADO COM ANTÍGENO BRUTO DE <i>Cysticercus bovis</i> EM WB.....	62
FIGURA 9 – EVOLUÇÃO DA AFINIDADE DOS FAGOS, ELUÍDOS POR COMPETIÇÃO, COM AS IGGS ANTI- <i>C. bovis</i> , NOS <i>PANNINGS</i> I, II, III, IV E V AVALIADOS POR ELISA.....	65
FIGURA 10 – TITULAÇÃO DE FAGOS.....	66
FIGURA 11 – REATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE SORO DE BOVINOS FRENTE AOS PEPTÍDEOS EM MEMBRANA DE CELULOSE.....	79

CAPÍTULO 2

FIGURA 12 – OS CISTICERCOS RECUPERADOS FORAM CLASSIFICADOS DE ACORDO COM O COMPRIMENTO OU DIÂMETRO DA VESÍCULA.....	99
---	----

FIGURA 13 – OS CISTICERCOS RECUPERADOS FORAM CLASSIFICADOS DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO.....	99
FIGURA 14 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CISTICEROCOS DE <i>Taenia crassiceps</i> EM ESTÁDIO LARVAL.....	101
FIGURA 15 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CISTICEROCOS DE <i>Taenia crassiceps</i> EM ESTÁDIO FINAL.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

GRÁFICO 1 – REATIVIDADE DOS FAGOS ELUÍDOS POR ACIDEZ FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX.....	64
GRÁFICO 2 – REATIVIDADE DOS FAGOS ELUÍDOS POR COMPETIÇÃO FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX.....	65
GRÁFICO 3 – FAGOS ELUÍDOS POR ACIDEZ (A1) E POR COMPETIÇÃO (C5) DIFERENCIAM <i>POOLS</i> DE SOROS BOVINOS.....	67
GRÁFICO 4 – <i>POOLS</i> DE FAGOS ELUIDOS POR ACIDEZ (A1) E POR COMPETIÇÃO (C5) FORAM CAPAZES DE DIFERENCIAR DOIS SOROS BOVINOS ALEATÓRIOS.....	68
GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS CLONES DE A1 FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI- <i>Cysticercus bovis</i>	69
GRÁFICO 6 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS CLONES DE C5 FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI- <i>Cysticercus bovis</i>	70
GRÁFICO 7 – REATIVIDADE DOS CLONES DE A1 FRENTE AO POOL DE SOROS BOVINOS POSITIVO E NEGATIVO.....	71
GRÁFICO 8 – REATIVIDADE DOS CLONES DE C5 FRENTE AO POOL DE SOROS BOVINOS POSITIVO E NEGATIVO.....	72

CAPÍTULO 2

GRÁFICO 9 – REATIVIDADE DOS SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM PEPTÍDEO NC-1 ACOPLADO AO BSA, ANTÍGENO BRUTO E BSA.....	97
GRÁFICO 10 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CISTICERCOS RECUPERADOS.....	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – DESTINO DE CARCAÇAS COM CISTICERCOSE.....	23
TABELA 2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Taenia saginata</i> E <i>Taenia solium</i>	26
TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CISTICERCOSE BOVINA.....	29
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CISTICERCOSE SUÍNA.....	29
TABELA 5 – PREVALÊNCIAS DA CISTICERCOSE BOVINA EM ESTADOS BRASILEIROS.....	30
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS DE <i>Cysticercus</i> <i>bovis</i>	60
TABELA 7 – SELEÇÃO DOS FAGOS COM PEPTÍDEOS LIGANTES DE ANTICORPOS ANTI- <i>Cysticercus bovis</i>	66
TABELA 8 – FAGOS, TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS PEPTIDICAS, FREQUÊNCIA COM QUE ELAS APARECERAM, AMINOÁCIDOS PREDOMINANTES DA ELUIÇÃO POR ACIDEZ E AS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS ENCONTRADAS.....	73
TABELA 9 – FAGOS, TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS PEPTIDICAS, FREQUÊNCIA COM QUE ELAS APARECERAM, AMINOÁCIDOS PREDOMINANTES DA ELUIÇÃO POR COMPETIÇÃO E AS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS ENCONTRADAS.....	74
TABELA 10 – IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS COM PROTEÍNAS DO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS (BLAST).....	75

CAPÍTULO 2

TABELA 11 – PROTEÇÃO INDUZIDA POR NC-1 CONTRA INFECÇÃO POR CISTICERCOS DE <i>T. crassiceps</i>	98
TABELA 12 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CISTICERCOS RECUPERADOS.....	100

LISTA DE SIGLAS

A	– Absorbância
aa	– Aminoácido
Abiec	– Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ALA	– Alanina
BNT's	– Barreiras Não-Tarifárias
BSA	– Albumina de Soro Bovino
CPPI	– Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
ELISA	– Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
Fagos	– Bacteriófagos
g	– Força gravitacional
HRP	– <i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	– Imunoglobulina
IgG	– Imunoglobulina G
kDa	– Quilo Dalton
LB	– Meio de cultura Luria-Bertani
M	– Mol
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	– Miligrama
mL	– Mililitro
mm	– Milímetros
nm	– Nanômetros
OPD	– Ortofenilenodiamina
<i>overnight</i>	– Período que equivale a 12-16 horas
PBS	– Tampão Fosfato Salino
PBS - T	– Tampão Fosfato Salino com adição do detergente Tween 20
PECi	– Proteínas de secreção/excreção
PEG	– Polietilenoglicol
PMSF	– Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PVDF	– Polifluoreto de Vinilideno

RIISPOA	– Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SDS-PAGE	– Sódio Dodecil Sulfato - Eletroforese em gel de Poliacrílamida
SIF	– Serviço de Inspeção Federal
SISBOV	– Serviço Brasileiro de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos
rpm	– Rotações por minuto
SIF	– Serviço de Inspeção Federal
TBS	– Tampão Fosfato Tris
TBS - T	– Tampão Fosfato Tris com adição de Tween 20
TcCa	– Antígeno Bruto de <i>Taenia crassiceps</i>
TU	– <i>Transductional unit</i>
UI	– Unidade Internacional
V	– Voltagem
WB	– <i>Western Blotting</i>
Well	– Poço

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
2	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	20
2.1	HISTÓRICO DA CISTICERCOSE.....	20
2.2	AGRONEGÓCIO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.....	21
2.2.1	RASTREABILIDADE.....	22
2.2.2	INSPEÇÃO VISUAL DA CARNE.....	22
2.2.2.1	CARCAÇA BOVINA COM CISTICERCOSE.....	22
2.2.3	EXPORTAÇÕES.....	23
2.3	COMPLEXO TENIOSE/CISTICERCOSE.....	24
2.3.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	24
2.3.1.1	<i>Taenia saginata</i>	24
2.3.1.2	<i>Taenia solium</i>	25
2.3.2	CICLO BIOLÓGICO.....	25
2.3.3	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CISTICERCOSE.....	27
2.3.4	DIAGNÓSTICO.....	31
2.4	PHAGE DISPLAY.....	33
2.5	TÉCNICA DE SPOT-SYNTHESIS.....	36
	CAPÍTULO 1: Imunosseleção de mimotopos de anticorpos bovinos contra <i>Cysticercus bovis</i> – perspectivas para o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico ante-mortem para a cisticercose bovina	38
	RESUMO	38
1	INTRODUÇÃO	39
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral.....	41
2.2	Objetivo Específico.....	41
3	METODOLOGIA	42
3.1	OBTENÇÃO DE SOROS DE BOVINOS COM CISTICERCOSE.....	43
3.1.1	OBTENÇÃO DE PROGLOTES E DE OVOS DE <i>Taenia saginata</i>	43
3.1.2	SELEÇÃO, MANUTENÇÃO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS ANIMAIS.....	43
3.1.3	NECROPSIA.....	44
3.2	OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA <i>Cysticercus bovis</i>	44
3.3	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>Cysticercus longicollis</i> E <i>Cysticercus bovis</i>	44
3.3.1	<i>Cysticercus longicollis</i>	44
3.3.2	<i>Cysticercus bovis</i>	45
3.4	ELISA.....	46
3.5	OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS TOTAIS (IG).....	46

3.6	OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS G (IgG) A PARTIR DAS IG TOTAIS.....	47
3.6.1	COLUNA DE AFINIDADE.....	47
3.7	CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO.....	48
3.7.1	SDS-PAGE.....	48
3.7.2	ELETROTRANSFERÊNCIA.....	49
3.7.3	IMMUNOBLOTTING.....	49
3.8	PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICAS ANTI- <i>Cysticercus</i> <i>bovis</i>	50
3.9	PHAGE DISPLAY – SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS EXPRESSOS NA SUPERFÍCIE DE FAGOS.....	50
3.9.1	SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA.....	50
3.9.2	BLOQUEIO DA PLACA E INCUBAÇÃO DOS FAGOS – PANNING 1.....	50
3.9.3	OBTENÇÃO DOS FAGOS POR ELUIÇÃO ÁCIDA E POR COMPETIÇÃO.....	51
3.9.3.1	ELUIÇÃO ÁCIDA.....	51
3.9.3.2	ELUIÇÃO POR COMPETIÇÃO.....	51
3.9.4	AMPLIFICAÇÃO DOS FAGOS ELUÍDOS.....	52
3.9.5	PRECIPITAÇÃO DOS FAGOS.....	52
3.9.6	TITULAÇÃO DOS FAGOS.....	53
3.9.7	DEMAIS PANNINGS.....	53
3.9.8	TESTE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS PANNINGS.....	53
3.10	SELEÇÃO E PRECIPITAÇÃO DOS CLONES.....	54
3.10.1	PRECIPITAÇÃO DO DNA VIRAL.....	54
3.10.2	CRESCIMENTO BACTERIANO E PRECIPITAÇÃO DO DNA.....	55
3.10.3	OBTENÇÃO DO DNA.....	55
3.11	SEQUENCIAMENTO.....	56
3.11.1	REAÇÃO DE SEQUECIAMENTO.....	56
3.11.1.1	PURIFICAÇÃO DO DNA.....	56
3.11.2	ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO.....	56
3.11.2.1	ANÁLISE DA IDENTIDADE COM OUTRAS SEQUÊNCIAS.....	57
3.12	SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS DE CELULOSE.....	57
3.12.1	IMUNOENSAIOS DOS PEPTÍDEOS.....	57
4	RESULTADOS	59
4.1	TESTES ELISA PARA SELEÇÃO DE SOROS.....	59
4.2	PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS BOVINAS.....	59
4.3	OBTENÇÃO DO ANTÍGENO <i>Cysticercus bovis</i>	59
4.4	WESTERN BLOTTING.....	61
4.5	IGGS ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX.....	63
4.6	PHAGE DISPLAY.....	63
4.7	SELEÇÃO DOS CLONES.....	68

4.8	SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS.....	72
4.9	IMUNOENSAIOS COM OS PEPTÍDEOS LIGADOS À MEMBRANA.....	77
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO	85
7	PERSPECTIVAS	86
	CAPÍTULO 2: Mimotopo de <i>Taenia solium</i> selecionado por <i>Phage Display</i> protege camundongos contra a infecção por metacestodeos de <i>Taenia crassiceps</i>.....	87
	RESUMO	87
1	INTRODUÇÃO GERAL	88
2	OBJETIVOS	90
2.1	Objetivo Geral.....	90
2.2	Objetivo Específico.....	90
3	METODOLOGIA	91
3.1	ANIMAIS.....	92
3.2	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	92
3.3	PROGRAMA DE IMUNIZAÇÃO E DESAFIO.....	93
3.4	ELISA PARA TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	93
3.5	DESAFIO, EUTANASIA E CONTAGEM DOS CISTOS.....	94
3.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	94
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	95
4	RESULTADOS	96
4.1	TÍTULOS DE ANTICORPOS SÉRICOS.....	96
4.2	PROTEÇÃO INDUZIDA POR NC-1.....	97
4.3	INFLUÊNCIA DA IMUNIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS CISTICERCOS.....	98
4.4	IMUNOMARCAÇÃO EM CISTICERCOS DE <i>Taenia Crassiceps</i>	100
5	DISCUSSÃO	103
6	ARTIGO	106
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
8	REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO GERAL

O complexo teniose/cisticercose é uma zoonose que possui distribuição mundial e envolve em seu ciclo biológico dois hospedeiros: o homem, hospedeiro definitivo das *Taenia saginata* e *Taenia solium*, e bovinos e suínos, hospedeiros intermediários dos metacestodas *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae* (OIE, 2008).

Apesar de ser conhecida desde a antiguidade, a teniose representa um grande problema de saúde pública atualmente e a cisticercose pode causar de condenação de carcaças, gerando perdas econômicas (OIE, 2008; BARROS et al., 2008).

A inspeção visual *post mortem* da carcaça é uma técnica realizada na tentativa de interrupção do complexo; contudo, ela tem baixa sensibilidade (MINOZZO et al., 2004), o que fundamenta a necessidade de diagnóstico para detecção de metacestódeos em animais vivos. A dificuldade de obtenção de bons extratos antigênicos torna crescente a busca por novas metodologias que auxiliem na identificação de proteínas específicas a serem utilizadas na detecção de anticorpos circulantes em animais.

Nos últimos anos, numerosos estudos têm utilizado a técnica do *Phage Display* em doenças infecciosas (MULLEN et al., 2006). A metodologia vem sendo aplicada para investigar interações moleculares e identificar peptídeos anti e/ou imunogênicos (KALAYCIOGLU et al., 2007). Assim, a técnica poderia ser útil na obtenção de mimotopos reconhecidos por anticorpos bovinos anti-*C. bovis*, para serem empregados no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina e para gerar peptídeos sintéticos que possam ser empregados em programas de imunização.

A presente dissertação descreve a seleção e obtenção de sequências aminoácídicas específicas para detecção de anticorpos bovinos contra *C. bovis*, na tentativa de encontrar bons antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico bovino da cisticercose (capítulo 1) e a investigação da proteção de um peptídeo de *Taenia solium* obtido por *Phage Display* em camundongos contra infecção experimental por *Taenia crassiceps* (capítulo 2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA CISTICERCOSE

A cisticercose foi descrita pela primeira vez em suínos pelo filósofo grego Aristóteles (384 – 322 a.C.). A partir disso, gerou-se um conceito equivocado de que o consumo da carne do animal transmitia o parasito aos humanos (GANC et al., 2004). Aristófanes (447 – 385 a.C), outro pensador grego, mencionou algumas enfermidades que acometiam animais e dentre elas, citou a cisticercose comparando-as a pequenas pedras que podiam ser vistas sob a língua de suínos (ALVES, 2000).

Em 1686, Malpighi e Redi verificaram que o agente causador das "pedras" descritas por Aristófanes se tratava de um parasito. Em 1758, Linnaeus descreveu o gênero *Taenia*. Alguns anos depois, Laennec criou o gênero *Cysticercus*. Andry, em 1718, fez uma ilustração de um parasito humano em forma de fita, na qual se visualizavam quatro ventosas e ausência da coroa de ganchos. Em 1782, Goeze descreveu a *Taenia saginata* (= *Taeniarhynchus saginatus*). Heuber e Kuckenmeister, em 1855, provocaram infecções no homem e no suíno, demonstrando o ciclo biológico da *T. solium*. Já o ciclo da *T. saginata* foi estabelecido por Leuckart, em 1861, que administrou proglotes por via oral a bezerros, obtendo a forma larval e por Oliver, em 1869, que infectou homens com cisticercos de bovinos (BROTTO, 1947; NIETO, 1982).

Apesar de ser conhecido desde a antiguidade, o complexo teniose/cisticercose ainda representa um grande problema de saúde pública e é causa de prejuízos econômicos na cadeia produtiva de carne. Das conseqüências relacionadas à saúde humana, a neurocisticercose deve ser considerada pela grande representatividade dentre as enfermidades que podem acometer o sistema nervoso central humano. Desse modo, o impacto sócioeconômico que gera é significativo, tanto pela inaptidão temporária ou permanente que ocasiona em indivíduos em idade produtiva, quanto pelo seu alto custo em relação ao diagnóstico, tratamento e programas de controle das enfermidades (GIROTTTO, 2008).

2.2 AGRONEGÓCIOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

A atividade pecuária se desenvolveu no Brasil na época da colonização, surgindo como atividade secundária e de suporte à produção de outras culturas.

A partir do final da década de 90, o aumento da incidência da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB - também conhecida por doença da “vaca louca”) na Europa e a declaração do governo britânico afirmando que o príon poderia transmitir ao ser humano o mal de Creutzfeldt-Jakob, tornaram crescente a preocupação com o consumo de carne de qualidade.

O fato ocorrido na Europa colocou em risco a credibilidade da segurança alimentar da carne vermelha, trazendo perdas para todo o setor e diminuindo tanto a oferta quanto o consumo do produto. Contudo, a carne bovina brasileira virou sinônimo de segurança alimentar e seu rebanho ganhou a expressão “boi verde”, como forma de destacar as características naturais da carne produzida no Brasil (JESUS, 2008).

A partir deste tempo, a posição brasileira como exportadora de carne bovina, tem se firmado cada vez mais no cenário internacional. Entretanto, o Brasil possui apenas 867 fazendas certificadas que podem exportar carne bovina para a União Européia (BEEFPOINT, 2010). A lista dessas propriedades foi atualizada em julho de 2010 pelo Serviço Brasileiro de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos (SISBOV), e conta com os Estados do Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (SISBOV, 2010).

A carne bovina é um produto cujo comércio está sujeito à determinação e imposição de normas técnicas e sanitárias. O Brasil apresenta atualmente, unidades muito modernas que produzem carnes e derivados de alta qualidade. Contudo, questões sanitárias podem configurar-se como barreiras não tarifárias (BNT's), interferindo na venda do produto (MIRANDA, 2001). Outro fator que pode contribuir com queda na exportação, é a falta de bois rastreados.

2.2.1 RASTREABILIDADE

A implantação do sistema de rastreabilidade tornou-se obrigatória em julho de 2002 para exportação de carne bovina *in natura* para a União Européia e em março de 2004, para os demais destinos. Hoje, toda a carne exportada pelo Brasil deve ser rastreada (FIGUEIRA, MIRANDA, s/d).

O SISBOV estabelece regras e normas para o processo de rastreabilidade de bovinos e define o termo como sendo o conjunto de ações, medidas e procedimentos adotados para caracterizar e identificar a propriedade de origem, a identificação individual do animal (mês do nascimento ou data de ingresso na propriedade, sexo, sistema de criação e alimentação), todos os registros das movimentações e os dados sanitários. Esta rastreabilidade visa dar maior segurança ao alimento proveniente dessa exploração econômica (FIGUEIRA, MIRANDA, s/d).

2.2.2 INSPEÇÃO VISUAL DA CARNE

Atualmente, o único método usado rotineiramente para detecção da cisticercose bovina e suína é a inspeção visual da carne. Trata-se de uma investigação anatomopatológica criteriosa, realizada por pessoas treinadas, após o abate do animal. O método também chamado de “corta e olha” é obrigatório desde 1952.

O artigo 176 do decreto 30.691/52, que regulamenta a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), especifica quais são os órgãos a serem inspecionados rotineiramente no exame *post-mortem*. São eles: cabeça, músculos mastigadores, esôfago, língua, diafragma, coração e músculos peitorais (BRASIL, 1952).

2.2.2.1 CARCAÇA COM CISTICERCOSE

O destino de carcaças com cisticercose, segundo o RIISPOA (BRASIL, 1952) foi resumido na TABELA 1.

Um animal altamente parasitado com *Cysticercus* sp. terá sua carcaça condenada (BRASIL, 1952; BARROS et al., 2008), causando prejuízos à economia.

TABELA 1 – DESTINO DE CARCAÇAS COM CISTICERCOSE.

Quantidade	Tratamento	Destino
1 cisto calcificado	-	Carcaça liberada
1 cisto vivo	Tratamento pelo frio (1°C por 10 dias) ou tratamento alternativo (salga – 21 dias)	Carcaça liberada
2 cistos calcificados	Tratamento pelo frio ou tratamento alternativo	Carcaça liberada
+ de 3 cistos em cerca de um palmo de extensão	-	Carcaça bovina condenada. Carcaça suína condenada, mas é permitido o aproveitamento de tecidos adiposos para o fabrico da banha
1 cisto		EXPORTAÇÃO PROIBIDA

Fonte: RIISPOA (BRASIL, 1952).

2.2.3 EXPORTAÇÕES

O mercado exportador da carne bovina realiza, atualmente, dois tipos de remessa do produto: *in natura* e industrializada. A primeira é feita basicamente nas formas resfriada e congelada (JANK, 1997) e seus principais mercados são a União Européia, o Chile, a Rússia, os países árabes do Oriente Médio e os países do Sudeste Asiático. Já a carne enlatada e a cozida congelada são exemplos do tipo industrializado do produto e é destinado ao público de menor poder aquisitivo da Europa, Estados Unidos e Oriente Médio (FIGUEIRA, MIRANDA, s/d).

Em 2010, os principais mercados da carne suína foram Rússia, Hong Kong, Ucrânia, Argentina, Angola, Cingapura, Uruguai, Cazaquistão e Emirados Árabes (ABIPECS, 2010).

Diversos fatores como o progresso tecnológico na pecuária de corte, maior sanidade do rebanho, implantação de programas de bem-estar animal e a existência de áreas de pastagens que permitam a produção de uma carne mais saudável têm garantido a competitividade da carne brasileira. Todavia, é indispensável dispor de

ferramentas de controle de qualidade do nosso produto, principalmente no que diz respeito à cisticercose.

2.3 COMPLEXO TENIOSE/CISTICERCOSE

2.3.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

2.3.1.1 *Taenia saginata*

Taenia saginata possui escoléx quadrangular com 4 ventosas que funcionam como órgãos de fixação, pescoço curto não segmentado, e estróbilo com aspecto de fita, composto por um grande número de proglotes com esfíncter vaginal e seu comprimento varia de 4 a 12 metros (podendo chegar a 25 metros) no intestino delgado humano (REY, 2008; OIE, 2008).

As proglotes são dotadas de sistema reprodutor hermafrodita e apresentam diferentes estádios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas. Os segmentos grávidos contêm cerca de 80.000 ovos cada um. O útero possui de 14 a 32 ramificações laterais, as ramificações uterinas são do tipo dicotômico e o ovário é bilobulado (REY, 2008).

Os ovos medem aproximadamente 30 a 45 µm de diâmetro, e são envoltos por uma espessa membrana protetora denominada embrióforo, cujo interior abriga um embrião hexacanto também denominado de oncosfera (SCIUTTO et al., 2000); são bastante resistentes, podendo permanecer viáveis por mais de sete meses sob condições ambientais adequadas (ROMMEL et al., 2000).

As formas metacestódeas constituem-se de uma vesícula ovóide e translúcida, com aproximadamente 7 – 10 mm de comprimento por 4 – 6 mm de largura apresentando, no seu interior, líquido vesicular e um escólex invaginado, geralmente visto com nitidez (REY, 2008).

2.3.1.2 *Taenia solium*

Taenia solium possui escoléx globoso com 4 ventosas e dupla coroa de ganchos, disposta sobre o rostelo, que auxiliam sua fixação à mucosa intestinal humana. O estróbilo é composto por aproximadamente 700 a 900 proglotes sem esfíncter vaginal e seu comprimento varia de 1,5 a 4 metros. O útero possui de 7 a 16 ramificações laterais e as ramificações uterinas são do tipo dendríticas. As proglotes saem passivamente, misturadas com as fezes do hospedeiro (REY, 2008).

O cisticerco de *T. solium* é maior que o de *T. saginata*, pois mede aproximadamente 5 – 20 mm de diâmetro. Sua vesícula é mais transparente, porém o escólex é menor (REY, 2008).

As principais características morfológicas de *T. saginata* e *T. solium* estão na TABELA 2.

2.3.2 CICLO BIOLÓGICO

O homem (hospedeiro definitivo) se infecta pela ingestão da carne bovina ou suína crua ou insuficientemente cozida, contendo formas viáveis dos metacestódeos *C. bovis* ou *C. cellulosae* (REY, 2008).

Sob ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, o escólex desenvagina e fixa-se no intestino delgado. Decorridos aproximadamente 2 a 3 meses de infecção, os segmentos grávidos destacam-se intactos do estróbilo e são eliminados espontaneamente com as fezes ou ativamente no intervalo das defecações (MINOZZO, 1997; OIE, 2008).

No ciclo natural, o bovino ou o suíno, hospedeiros intermediários, se infectam pela ingestão de ovos do parasito, oriundos de material fecal humano contaminado, dispersos na pastagem e/ou na água (REY, 2008).

TABELA 2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Taenia saginata* E *Taenia solium*.

Morfologia	<i>Taenia saginata</i>	<i>Taenia solium</i>
Tamanho	4 a 12 metros	1,5 - 4 metros
Escólex	Quadrangular	Globoso
Estrutura de fixação	4 ventosas	4 ventosas e dupla fileira de ganchos
Número de ganchos	-	22 - 32
Estróbilo	1.000 a 2.000 proglotes	700 a 900 proglotes
Proglotes	Saem ativamente no intervalo das defecações	Saem passivamente com as fezes
Esfíncter Vaginal	Presença de esfíncter vaginal bem desenvolvido.	Não há presença de esfíncter vaginal
Testículos	300 a 400	150 a 200
Tamanho das Proglotes grávidas	O comprimento é 3 a 4 vezes maior que a largura	7 - 12 mm de comprimento por 5 - 6 mm de largura
Útero	14 a 30 ramificações	7 a 16 ramificações
Ramificações uterinas	Do tipo dicotômicas	Do tipo dendríticas
Proglote grávida: quantidade de ovos	80.000	30.000 a 50.000
Primeiras proglotes evacuadas	87 dias	60 a 70 dias
Ovos	30 a 40 mm de diâmetro – indistinguíveis morfologicamente	
Nomenclatura do cisticerco – sem valor taxonômico	<i>Cysticercus bovis</i>	<i>Cysticercus cellulosae</i>
Tamanho do cisticerco	7 - 10 mm de comprimento por 4 - 6 mm de largura	5 - 20 mm de diâmetro
Cisticerco torna-se infectante	Após 10 semanas	Após 60 a 75 dias
Longevidade do adulto	30 anos	25 anos

FONTE: Adaptado de REY (2008).

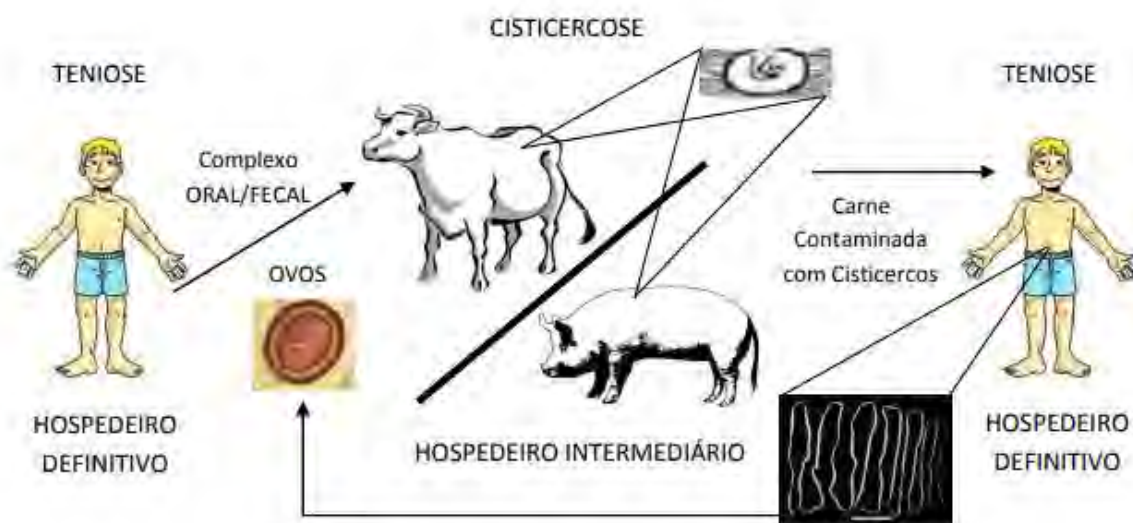
Depois de deglutidos, os ovos seguem para o estômago, onde sofrem perda da membrana externa protetora, mediada pela pepsina. No intestino, o embrião hexacanto sofre ação de sais biliares, e segue no sentido das vilosidades, para penetrar e invadir vênulas, veias e vasos linfáticos. Pela corrente circulatória, ele é transportado para órgãos e tecidos do animal, atravessando a parede do vaso, e instalando-se nos tecidos circunvizinhos (HAWK et al., 2005).

Se o homem se alimentar com carne (crua ou mal-cozida) contaminada com *C. bovis* ou *C. cellulosae* viáveis, e eliminar ovos que possam ser deglutidos por bovinos ou suínos, o ciclo biológico do parasito se completa (FIGURA 1).

Acidentalmente, o ser humano pode desenvolver a cisticercose, atuando como hospedeiro intermediário do parasito (impasse parasitário). O mesmo se contamina ao

ingerir ovos viáveis de *T. solium* que fazem o ciclo semelhante ao descrito para os verdadeiros hospedeiros intermediários e desenvolvem cisticercos que podem se alojar no sistema nervoso central. Ainda que o *C. cellulosae* seja responsável pela generalidade dos casos desse tipo de parasitismo, sabe-se que os ovos de *T. saginata*, *Taenia multiceps*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* e *Taenia taeniformis* também podem estar associadas à cisticercose humana (REY, 2008).

FIGURA 1 – Ciclo biológico do complexo teniose/cisticercose.



Fonte: Autor (2011)

2.3.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CISTICERCOSE

O complexo teniose/cisticercose engloba doenças com epidemiologias totalmente diferentes: a teniose humana e a cisticercose bovina e suína. Ele se estabelece de acordo com as condições sociais, econômicas e culturais mas, mais comumente em ambientes caracterizados pela urbanização desordenada, ausência ou precariedade de saneamento básico e educação sanitária, em locais com técnicas pecuárias primitivas, com insalubridade ambiental, técnicos com deficiências de instrução e inspeção e controle da carne ineficientes (CARRADA-BRAVO, 1987, GEYSEN et al., 2007).

A prevalência de *Taenia* sp. pode ser dividida em três grupos: 1 - altamente endêmica: em países ou regiões com prevalência na população humana, acima de 10%;

2 - moderada prevalência: com taxa de infecção entre 0,1 e 10%; e 3 - baixa prevalência: com taxa de infecção inferior a 0,1% ou mesmo livres da endemia (PAWLOWSKI; SCHULTZ, 1972).

Embora existam relatos de sua distribuição mundial, inclusive em países desenvolvidos, a ocorrência da cisticercose é mais evidente em países em desenvolvimento (TABELAS 3 e 4). Entre os países com alta endemicidade humana para a *T. saginata*, destacam-se os países Etiópia, Quênia, Suazilândia, Guiné-Bissau, Iugoslávia, Síria e Líbano. Para *T. solium*, as regiões de maior endemicidade se encontram em Guiné-Bissau, Costa do Marfim, Nigéria, Angola, Equador, Honduras e Nicarágua.

O Brasil, considerado de média endemicidade para *T. saginata* e *T. solium*, tem prevalência média da cisticercose bovina de 5% (SOUZA et al., 2007), enquanto que a cisticercose suína nos anos de 2002 a 2004 teve média de 0,007% (SIF/MAPA, 2004).

Na TABELA 5, são apresentadas as prevalências da cisticercose bovina em alguns estados brasileiros. É possível, no entanto, que o número de cisticercos encontrado seja baseado em exames feitos nos órgãos avaliados rotineiramente, assim, acredita-se que a porcentagem real seja de cinco a cinquenta vezes maior (GEERTS et al., 1981; MINOZZO et al., 2002; 2004), tendo em vista que alguns cistos possam estar em tecidos não inspecionados, ou não detectados pela avaliação visual.

Tejada e colaboradores (2010) analisaram informações encaminhadas pelos fiscais do Departamento de Produção Animal – DPA de 496 municípios do Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2001 até dezembro de 2009 e constataram que dentre as diferentes espécies de animais abatidos (bovinos, bubalinos, ovinos, suínos e caprinos), os bovinos foram o grupo que teve a maior prevalência de cisticercose (48%).

Vê-se que ainda atualmente a cisticercose é uma parasitose importante e de difícil controle.

TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CISTICERCOSE BOVINA.

Países	Fonte
Bélgica	DORNY et al., 2000
Austrália	BROWN et al., 2010; PEARSE et al., 2010
Suíça	FLUTSCH et al., 2008
Alemanha	MOBIUS, 1993; ABUSEIR et al., 2010
Polônia	WALOCH, 2010
Espanha	ALLEPUZ, 2009
Equador	RODRÍGUEZ-HIDALGO et al., 2003
Quênia	ONYANGO-ABUJE et al., 1996; ASAAVA et al., 2009
Egito	HARIDY et al., 1999
Tanzânia	MAEDA, 1996
Indonésia	WANDRA, 2006
Etiópia	ABUNNA et al., 2008; KEBEDE, 2008
Tailândia	WAIKAGUL et al., 2006
Nigéria	CADMUS; ADESOKAN, 2009
Irã	ORYAN et al., 1995; KHANIKI et al., 2010
Suazilândia	HUGHES et al., 1993
Zâmbia	DORNY et al., 2002
Brasil	UNGAR; GERMANO, 1992; MINOZZO et al., 2002; PEREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2007a; SANTOS, 2008

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CISTICERCOSE SUÍNA.

(continua)

Países	Fonte
Gâmbia	SECKA et al., 2010
Senegal	SECKA et al., 2010
Tanzânia	NGOWI et al. 2004; MKUPASI et al., 2011
Zaire	PRAET et al., 2010
Zâmbia	PHIRI et al., 2002
Nigéria	GWEBA et al., 2010
Moçambique	PONDJA et al. 2010

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA CISTICERCOSE SUÍNA.

(conclusão)

Países	Fonte
Kênia	KAGIRA et al., 2010
Venezuela	CORTEZ ALCOBEDES et al., 2010
Perú	GONZALEZ et al., 1990
Brasil	ALVES, 2000; SAKAI et al., 2001; SILVA et al., 2007; IASBIK et al. 2010
México	SARTI et al. 1992; MORALES et al., 2008; BOBES et al., 2010

TABELA 5 – PREVALÊNCIAS DA CISTICERCOSE BOVINA EM ESTADOS BRASILEIROS.

Estado	Ano de estudo	Nº de animais abatidos	Prevalência	Fonte
Rio Grande do Sul	1996	7.611	4,63%	CORREIA et al., 1997
Rio Grande do Sul	2003	650.351	1,72%	SIG-SIF/Mapa, 2003
Santa Catarina	2003	76.690	0,88%	SIG-SIF/Mapa, 2003
Santa Catarina	2006	19.072	1,40%	SANTOS, 2008
Paraná	2000	26.465	3,93%	SOUZA et al., 2007a
Paraná	2000	26.633	3,82%	SOUZA et al., 2007b
São Paulo	1990-2000	1.976.824	4,18%	FERNANDES; BUZETTI, 2001
São Paulo	2000-2002	625.593	1,94%	FERNANDES et al., 2002
São Paulo	1999-2001	-	9,73%	MANHOSO; PRATA, 2004
São Paulo	1996-2000	1.967.816	7,39%	MARQUES et al. 2008
Minas Gerais	2003	278.505	0,44%	SIG-SIF/Mapa, 2003
Rio de Janeiro	1997-2003	494.620	1,95%	PEREIRA et al., 2006
Rio de Janeiro	2003	7.625	7,46%	SIG-SIF/Mapa, 2003
Mato Grosso do Sul	2007	74.715	0,16%	VOLLKOPFÝ; XAVIER, s/d
Espírito Santo	2002	55.224	1,20%	SIG-SIF/Mapa, 2002
Rondônia	2004	1.086.817	0,03%	SIG-SIF/Mapa, 2004
Goiás	2003	2.198.737	0,0065%	SIG-SIF/Mapa, 2003
Bahia	2005	2.778	4,20%	ALMEIDA et al., 2006
Bahia	2007	92.944	0,91%	SANTOS, 2008

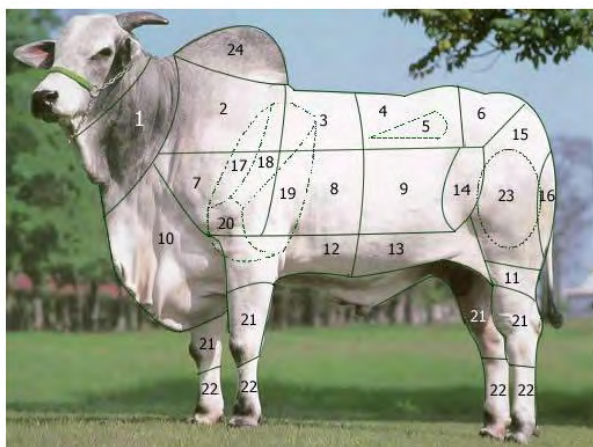
2.3.4 DIAGNÓSTICO

Segundo o RIISPOA, o diagnóstico de rotina da cisticercose bovina é baseado no exame anatomopatológico durante a inspeção *post mortem*. O exame de rotina é a pesquisa de cistos nas linhas de inspeção nos seguintes órgãos: cabeça, língua, coração, diafragma e esôfago e é feito segundo normas padronizadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 1952).

Quando são encontrados cisticercos nas linhas de inspeção, as lesões são identificadas e as meias-carcaças, juntamente com as vísceras e cabeça, são encaminhadas para o Departamento de Inspeção Final (DIF) onde são examinadas pelo médico veterinário responsável, conforme procedimentos regulamentares.

No entanto é crescente o número de trabalhos científicos apontando que as regiões anatômicas nas quais os cisticercos podem se alojar não são necessariamente as avaliadas no exame *post-mortem*. Lopes e colaboradores (2010) recuperaram 9.258 cisticercos de 25 animais infectados experimentalmente e encontraram altos níveis de parasitismo em paleta (12,55%), fígado (9,48%), lombo (7,26%) e patinho (6,63%) (FIGURA 2), locais não inspecionados no exame de rotina. Por outro lado, houve um baixo nível de parasitismo de *C. bovis* em esôfago e diafragma. Minozzo e colaboradores (2002) encontraram cisticercos viáveis nos pulmões, fígado, rins e musculatura esquelética anterior e posterior.

FIGURA 2 – Tipos de corte bovino.



- | | |
|-----|-----------------------------|
| 1 | Pescoço |
| 2 | Agulha (Acém) |
| 3 | Filé de Costela (Entrecôte) |
| 4 | Contrafilé |
| 5 | Filé Mignon |
| 6 | Alcatra |
| 7 | Costela do Dianteiro |
| 8-9 | Costela |
| 10 | Peito |
| 11 | Músculo Mole |
| 12 | Ponta de Peito |
| 13 | Vazio |
| 14 | Patinho |
| 15 | Coxão Duro |
| 16 | Lagarto |
| 17 | Peixinho |
| 18 | Aquete |
| 19 | Miolo da Paleta |
| 20 | Paleta |
| 21 | Músculo Duro (Garrão) |
| 22 | Patas |
| 23 | Coxão Mole |
| 24 | Cupim |

Fonte: Disponível em <http://joanamalta.blogspot.com/2010/05/cortes-bovinos.html>

Para a detecção da cisticercose *ante-mortem*, é necessária uma técnica altamente sensível, pois em condições naturais, a maioria dos bovinos infectados exibe mínimo grau de infecção (Geerts et al., 1981).

Os exames sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e *immunoblot* têm sido propostos para o diagnóstico da cisticercose bovina com o uso de antígenos brutos (DRAELANTS et al., 1995; OGUNREMI, BENJAMIN, 2010), heterólogos (MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; 2007; PINTO et al., 2006; GIROTTI et al. 2008; THOMAZ-SOCCOL et al., 2010) e peptídeos sintéticos (FERRER et al., 2003; 2007; ABUSEIR et al., 2007). Ainda exames imunohistoquímicos e moleculares foram avaliados para o diagnóstico da cisticercose (GONZÁLEZ, 2000; OGUNREMI et al., 2004; CHIESA, 2010). Outra alternativa poderia ser a utilização de métodos sensíveis que permitissem o diagnóstico sorológico preciso da infecção, como por exemplo, o uso de peptídeos sintéticos que mimetizassem os epítomos do *C. bovis*, obtidos pela técnica do *Phage Display*.

2.4 PHAGE DISPLAY

Bibliotecas de peptídeos têm sido utilizadas para determinar as regiões específicas (epítopos) as quais os anticorpos se ligam, na interação antígeno-anticorpo. Os anticorpos podem reconhecer seus sítios de ligação, baseados em três ou quatro resíduos de aminoácidos conservados e desse modo, é possível definir a região de uma proteína reconhecida por um anticorpo, pela técnica do *Phage Display* (ARAP, 2005). A metodologia foi inicialmente desenvolvida por George Smith em 1985, quando o pesquisador descobriu que pequenos fragmentos aleatórios de DNA poderiam ser inseridos no material genético do vírus filamentosso Ff (FIGURA 3A), criando uma proteína de fusão incorporada no virion, sem interferir na sua capacidade de infectividade. Assim, polipeptídeos, produtos do DNA exógeno, poderiam ser expressos na superfície viral de uma forma imunologicamente acessível (SMITH, 1985).

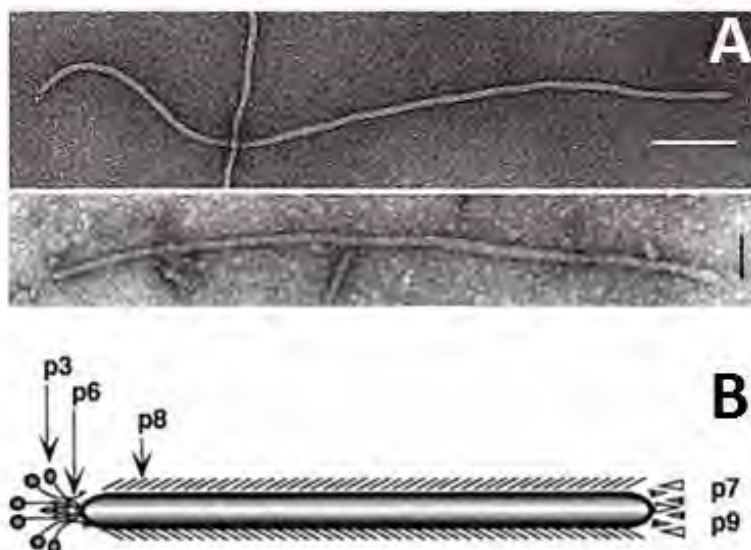
A inserção de sequências de nucleotídeos no genoma viral é feita em regiões pré-determinadas e permite a construção de uma biblioteca conformacional (SMITH, 1985). Esta biblioteca é planejada de modo a criar uma população de ligantes em potencial, uma vez que cada bacteriófago – ou fago (membro da biblioteca) possui uma forma distinta de peptídeo, permitindo diferentes tipos de interação com a molécula alvo (SCOTT, SMITH, 1990).

A técnica possibilita expressar um grande número ($\geq 10^{11}$) de peptídeos na superfície de fagos (SIDHU et al., 2000). Quanto maior o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente um ligante específico poderá ser encontrado (POSNER et al., 1994). Assim, *Phage Display* é utilizado em uma grande variedade de aplicações, que incluem desde o estudo de interações proteína-proteína e receptor-ligante de anticorpo, até modificação de propriedades protéicas, seleção de anticorpos afins a uma variedade de antígenos, mapeamento de muitos epítopos de anticorpos mono e policlonais, identificação de ligantes de drogas e, por fim, isolamento de anticorpos com alta afinidade, isolamento e engenharia de anticorpos recombinantes (BRADBURY, 2010). A equipe coordenada por Blank (1999) cita que peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como reagentes para diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças autoimunes, além de

numerosos estudos que têm utilizado a técnica para abordar aspectos específicos de doenças infecciosas (MULLEN et al., 2006). A tecnologia tem tido grande influência nas descobertas realizadas nas áreas de imunologia, biologia celular e farmacologia (ARAP, 2005).

O bacteriófago atua como uma bioferramenta na técnica de *Phage Display* e caracteriza-se por ser um vírus do gênero *Inovirus*, que infecta bactérias gram-negativas. As partículas virais utilizadas no *Phage Display* são os fagos filamentosos Ff que incluem as cepas M13, f1, Fd e ft. Eles são compostos por 5 proteínas estruturais que contribuem para a estabilidade da partícula viral: P3, P6, P7, P8 e P9, que juntas formam a estrutura de um longo capsídeo protéico cilíndrico, com aproximadamente 930 nm de comprimento e 6,5 nm de diâmetro. O DNA fita simples é protegido pelo capsídeo e é composto por aproximadamente 6.400 nucleotídeos (ARAP, 2005). No fago selvagem, há cerca de 2.800 cópias da proteína P8. Nas extremidades do capsídeo, encontram-se de 3 a 5 cópias das demais proteínas estruturais. A P7 e P9 encontram-se na extremidade distal enquanto a P3 e P6 estão na proximal, como mostrado na FIGURA 3B. A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos é feita pela fusão com as proteínas estruturais P8 e P3 (FUMAGALLI, 2008). Além disso, a P3 é necessária para o reconhecimento e infecção da célula hospedeira.

FIGURA 3 – Estrutura do bacteriófago filamentoso (A). P3, P6, P8, P9 e P7 representam as proteínas estruturais do vírus (B). Geralmente, os peptídeos codificados pelo DNA exógeno, são expressos na P3 ou P8.



Fonte: Adaptada de: FAUQUET et al., 2005.

Quando comparadas a outras tecnologias de expressão, o *Phage Display* apresenta vantagens: uma delas é que os vírus filamentosos não lisam as células infectadas, o que possibilita uma melhor separação das partículas virais, eliminando a reatividade cruzada com proteínas bacterianas (RUSSEL et al., 1997; FUMAGALLI, 2008). Outro benefício é a seleção de epítopos descontínuos, possibilitando selecionar mimotopos (GEYSEN et al., 1986). Os ligantes podem ser testados *in vitro* e *in vivo* e pode-se utilizar amostras de soro na seleção dos peptídeos, estratégia que pode ser aplicada em imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, porque seleciona ligantes de anticorpos presentes no sangue.

A expressão de peptídeos aleatórios fusionados a proteínas do capsídeo do vírus é uma forma eficiente de identificar pequenas sequências de aminoácidos, reconhecidas por anticorpos. As sequências podem ser idênticas ao epítopo natural (MURTHY et al., 1998), ou apresentar uma composição de aminoácidos completamente diferente e mimetizar aquela região específica, denominada mimotopo.

Normalmente, as bibliotecas são geradas para codificar pequenos peptídeos, que podem variar em tamanho de 6 a 45 aminoácidos, mantendo grande diversidade. Elas ainda podem ser exibidas de forma linear ou como seqüências conformacionais

devido a presença de cisteínas capazes de formar pontes dissulfeto (NEWTON; DEUTSCHER, 2008).

Como exemplos da grande diversidade de emprego da técnica do *Phage Display*, Kirsch e colaboradores (2008) se interessaram em criar um método diagnóstico específico e sensível para o vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) e empregaram a metodologia para obtenção de antígenos. Hell e colaboradores (2009) e o grupo de Ribeiro (2010) também utilizaram a técnica para selecionar epitopos/mimotopos de *T. solium*, na tentativa de criar um diagnóstico para neurocisticercose humana.

Uma vez que o fago seja selecionado pelos anticorpos presentes no soro de animais infectados com algum patógeno, o DNA viral pode ter a sequência nucleotídica conhecida e a sequência protéica identificada (HAMBY et al. 2005). Assim, o peptídeo pode ser sintetizado quimicamente e empregado como instrumento em imunizações (FISHER, HOWDEN, 1994) e/ou em imunodiagnósticos (SOMPURAM et al., 2002).

2.5 TÉCNICA DE *Spot-synthesis*

A técnica de *Spot-synthesis* foi apresentada pela primeira vez em 1990, como sendo uma metodologia que pode ser utilizada no mapeamento de epitopos (ALVARENGA et al., 2002). A identificação de epitopos específicos pode fornecer informações sobre os aspectos funcionais de uma molécula e apresentar informações importantes em estudos imunoquímicos.

A técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos mono ou policlonais frente a peptídeos sintetizados sobre uma membrana de celulose (FRANK, 1992). Um grande número de peptídeos pode ser sintetizado e testado simultaneamente para identificar e caracterizar os sítios de ligação de interesse. O peptídeo ainda pode ser sintetizado de forma sobreposta ou ter um aminoácido substituído por uma alanina ou serina (*ALA scan*).

A técnica de *ALA scan* constitui-se na substituição de cada resíduo de aminoácido da sequência original por uma alanina (ou, se o aminoácido original for uma

alanina, este será substituído por uma serina). A técnica é útil no mapeamento de epítomos e no entendimento da relação antígeno-anticorpo.

Considerando-se o que foi explanado, a proposta do capítulo 1 deste trabalho foi identificar ligantes de antígenos pela técnica de *Phage Display* que possam ser utilizados em um ensaio sorológico para serem empregados no diagnóstico da cisticercose bovina.

Posteriormente, no capítulo 2, foi investigado se um peptídeo de 15 aminoácidos de *T. solium* obtido por Hell e colaboradores (2009), pela técnica, seria eficaz na proteção de camundongos contra infecção experimental por *T. crassiceps*.

CAPÍTULO 1

IMUNOSSELEÇÃO DE MIMOTOPOS DE ANTICORPOS BOVINOS CONTRA *Cysticercus bovis* – PERSPECTIVAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DIAGNÓSTICO ANTE-MORTEM PARA A CISTICERCOSE BOVINA.

RESUMO

A presença de *Cysticercus bovis* (*Taenia saginata*) na musculatura bovina representa um grande problema de saúde pública e é causa de prejuízos econômicos na cadeia produtiva de carne. Na tentativa de interrupção do complexo teniose/cisticercose, a inspeção visual anatomopatológica realizada após o abate do bovino é o método de rotina em matadouros; contudo, mesmo que realizada por técnicos qualificados, ela é pouco sensível. Neste sentido, o desenvolvimento de um imunoensaio que seja sensível na detecção de cisticercos em animais, ainda vivos, que permita o tratamento prévio ao abate, torna-se necessário. O desafio é encontrar um antígeno que possa ser produzido biotecnologicamente em grande quantidade e que apresente características antigênicas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi selecionar, por *Phage Display*, mimo- ou epitopos específicos para imunoglobulinas G (IgG) bovinas específicas anti-escólex de *C. bovis*. Como estratégia para a técnica, dois tipos de eluição foram realizadas: por acidez e por competição. Os testes ELISA mostraram que a primeira e a quinta seleção (*panning*) das eluições por acidez e competição, foram capazes de identificar fagos com sequências aminoacídicas reativas frente as IgGs específicas. As absorbâncias do *pool* de fagos eluídos por acidez e por competição foram 2,7 e 3 vezes maiores frente ao *pool* positivo de soros bovinos em relação ao *pool* de soros negativos, respectivamente, o que mostra que os fagos reconhecem e diferenciam soros de animais com cisticercose. Trinta e oito fagos tiveram seus DNAs seqüenciados, sendo 14 provenientes da eluição por acidez e 24 da eluição por competição. A seqüência BC-17 repetiu-se em 62,5% (15/24) dos achados e a BC-18 em 12,5% (3/24). Ainda, 19 peptídeos tiveram identidade com sequências de *T. saginata* depositadas em banco de proteínas online, sendo que três clones eluídos por competição tiveram identidade com duas proteínas – peptídeos de *T. saginata* homólogo ao antígeno 45W de *Taenia ovis* e antígenos de adesão secretados pela oncosfera de *T. saginata* – já usadas no diagnóstico laboratorial da cisticercose bovina. A técnica do *Phage Display* mostrou-se eficiente para a seleção de peptídeos reativos com anticorpos de bovinos com cisticercose, sugerindo que estes mimotopos são promissores no sentido de sua utilização em kits diagnósticos para detecção *ante-mortem* da cisticercose.

Palavras-chave: *Phage Display*. Cisticercose bovina. *Cysticercus bovis*.

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina é uma enfermidade de distribuição cosmopolita, com caráter zoonótico e é causada pelo metacestoda *Cysticercus bovis* que está presente na musculatura do bovino, hospedeiro intermediário deste parasito. O homem, hospedeiro definitivo da *Taenia saginata*, alberga o parasito adulto no intestino delgado e elimina proglotes ativamente com as fezes e no intervalo das defecações, contaminando o ambiente (SOUZA et al., 2007; REY, 2008; OIE, 2008).

As ações preventivas de controle do complexo teniose/cisticercose baseiam-se num conjunto de medidas que visam impedir a infecção do homem pela *T. saginata*, dos bovinos pelos cisticercos e, com isto, bloquear o ciclo desse parasito na natureza. O recurso de maior expressão e importância é a inspeção visual da musculatura bovina realizada durante a vistoria anatomopatológica *post mortem* de carcaças e vísceras e a avaliação com saneamento adequado das carcaças parasitadas.

Mesmo que realizada por técnicos qualificados, durante a inspeção de rotina, alguns cistos podem passar despercebidos, levando a resultados falso-negativos, uma vez que as peças não podem ser examinadas minuciosamente, dada a necessidade de evitar a descaracterização comercial da carne, quando não há suspeita da doença (PINTO et al., 2006). Este fato faz com que a sensibilidade do método seja baixa, especialmente em infecções leves, no qual 25 a 50% dos animais infectados (MINOZZO et al., 2002; 2004; OIE, 2008) não são diagnosticados.

Outro problema está na dificuldade de se localizar cistos em animais com infecção discreta, ou seja, com poucos cistos. Segundo McCool (1979), na rotina de inspeção, raramente ocorrem infecções intensas; o que se observa frequentemente é um ou dois cisticercos. Souza e colaboradores (2007) analisaram 26.633 bovinos e 94% dos animais infectados era monocisticercósicos, fato que torna o diagnóstico tradicional da cisticercose um recurso pouco sensível (MINOZZO et al., 2002; WANZALA et al., 2003; PINTO et al. 2006).

Já nos anos 80, Murrel e colaboradores (1986) avaliaram os métodos de imunodiagnósticos e levantaram a hipótese que eles seriam de grande utilidade para a detecção do parasito em animais em campo, visto que os infectados tornar-se-iam

passíveis de identificação e tratamento antes do abate, promovendo redução das perdas econômicas dos pecuaristas.

O aprimoramento de testes imunodiagnósticos que utilizem antígenos recombinantes se faz necessário diante da dificuldade de obtenção de antígenos brutos e heterólogo. O *Phage Display* é uma técnica através da qual se consegue identificar ligantes de anticorpos específicos. Assim, após selecionar o antígeno de interesse, pode-se produzir biotecnologicamente e utilizá-lo em ensaios diagnósticos.

Visando melhorar a sensibilidade do método de diagnóstico da cisticercose em bovinos vivos foi realizado o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

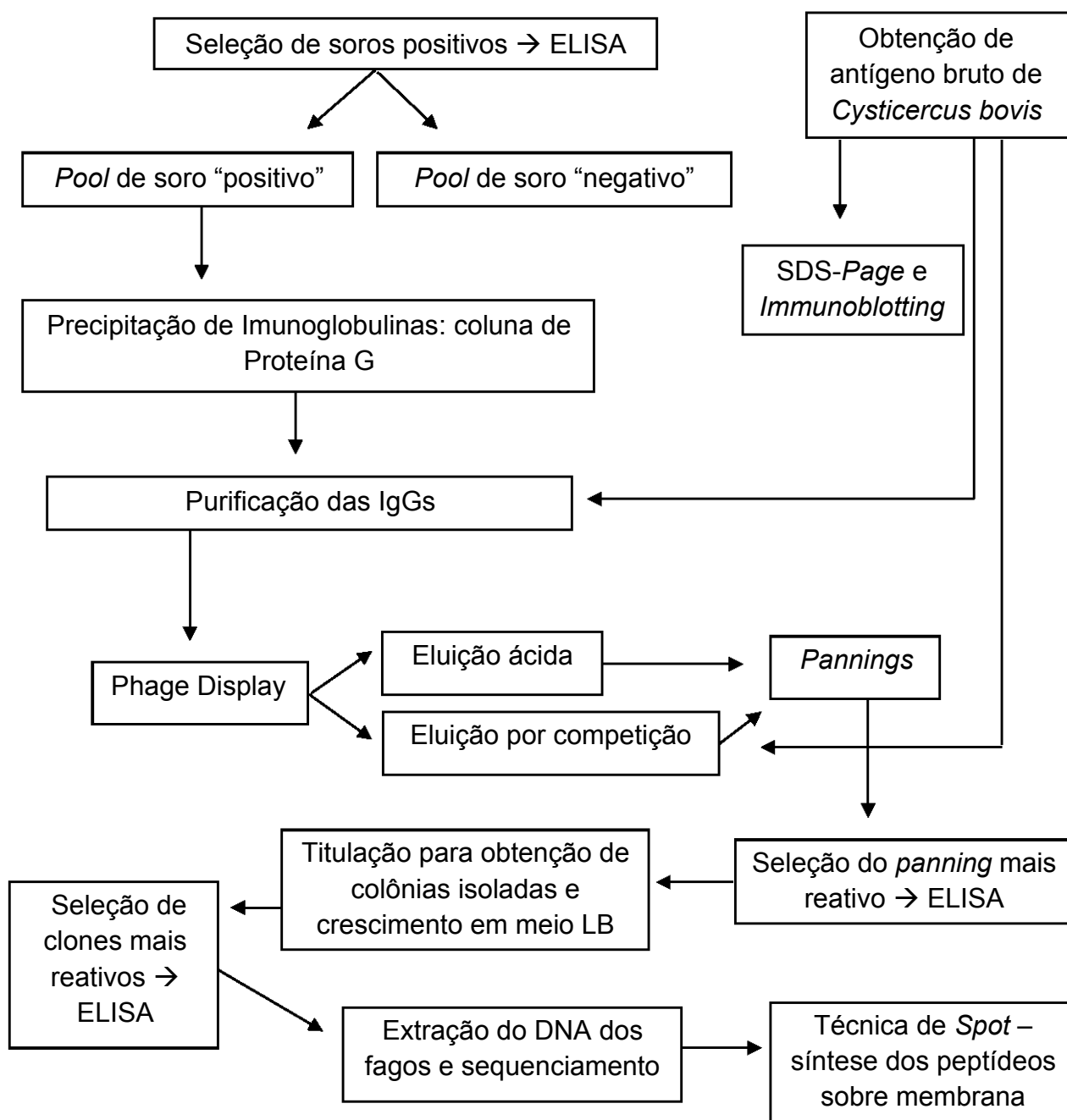
Selecionar, a partir de uma biblioteca randômica de peptídeos apresentados em fagos, mimó- ou epitópos específicos para anticorpos bovinos contra *Cysticercus bovis* que possam ser empregados em diagnóstico por imunoensaio, visando identificar animais infectados.

2.2 Específicos

1. Selecionar, por testes ELISA, soros de bovinos infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata* que apresentem altos títulos de anticorpos contra *C. bovis*;
2. Precipitar imunoglobulinas (Ig) G totais a partir de amostras de soro selecionadas pelo teste ELISA;
3. Purificar IgG específicas anti-*C. bovis*;
4. Selecionar, através da técnica de *Phage Display*, clones que sejam reativos às IgGs específicas.
5. Sequenciar o DNA dos bacteriófagos que expressarem peptídeos reativos frente aos anticorpos específicos;
6. Sintetizar quimicamente os peptídeos selecionados, em membranas de celulose, pela técnica de *Spot synthesis*;
7. Determinar os antígenos mais antigênicos, pela técnica de *Spot synthesis*, bem como identificar os aminoácidos (aa) essenciais para o reconhecimento do anticorpo, pela técnica do *ALA scan*.

3. METODOLOGIA

A fim de alcançar os objetivos propostos, o fluxograma apresentado abaixo resume os diferentes instrumentos e etapas realizadas neste estudo.



3.1 OBTENÇÃO DE SOROS DE BOVINOS COM CISTICERCOSE

Para o estudo da resposta antigênica de bovinos frente a infecção por ovos de *T. saginata*, a equipe coordenada pela Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, do Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o Prof. Dr. Alvimar Costa, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Jaboticabal, SP infectou 1057 animais com ovos do parasito, entre os anos de 2003 e 2007 (LOPES et al., 2010). Apesar da infecção experimental não fazer parte deste trabalho, serão colocados resumidamente, os procedimentos adotados para a obtenção dos soros utilizados neste estudo.

3.1.1 OBTENÇÃO DE PROGLOTES E DE OVOS DE *Taenia saginata*

Proglotes grávidas isoladas ou em cadeias foram obtidas de exames coproparasitológicos do laboratório Municipal de Curitiba.

Após a separação do material fecal, as proglotes foram lavadas em soro fisiológico (NaCl 0,9%). Depois da comprovação morfológica, elas eram dissecadas sob microscópio estereoscópico para obtenção dos ovos, que foram contados e separados em soluções de 1.000 ovos/mL de soro fisiológico, contendo estreptomicina (200 µg/mL) e penicilina (20.000 UI).

3.1.2 SELEÇÃO, MANUTENÇÃO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS ANIMAIS

Bezerros da raça Holandesa entre 3 e 6 meses de idade foram adquiridos de fazendas dos Estados de São Paulo e/ou Minas Gerais com boas condições sanitárias. Os soros destes animais foram submetidos a testes ELISA para pesquisa de anticorpos (MINOZZO et al., 2004). Somente os animais com sorologia negativa para cisticercose foram selecionados para o experimento. Por 90 dias, os bovinos foram confinados no Centro para Pesquisa em Parasitologia (CEPPAR) da UNESP, em baias com condições ambientais e sanitárias semelhantes com bebida e alimentação *ad libidum*.

Para a infecção experimental, as soluções contendo os ovos eram aspiradas com seringas de 20 mL e administradas por via oral.

3.1.3 NECROPSIA

Após o período pré-patente, os animais foram abatidos segundo normas oficiais de inspeção. Amostras de sangue foram coletadas para separação do soro e análises por testes ELISA. Todas as carcaças e órgãos foram refrigerados, transportados e inspecionados minuciosamente para confirmação da infecção por cisticercos. Os cistos foram classificados como vivos (membrana externa translúcida e larvas móveis) e calcificados.

Após os trabalhos referentes à pesquisa serem realizados, os soros foram estocados a -20°C até a presente utilização.

3.2 OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA *Cysticercus bovis*

Soro de coelho infectado experimentalmente com extrato bruto de *C. bovis* foi cedido por nosso colaborador Dr. João Carlos Minozzo do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara, PR.

3.3 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *Cysticercus longicollis* e *Cysticercus bovis*

3.3.1 *Cysticercus longicollis*

O antígeno heterólogo de *C. longicollis* foi cedido por nosso colaborador Dr. João Carlos Minozzo do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara, Paraná.

Para a produção deste antígeno foi utilizada a cepa ORF da larva da *Taenia crassiceps* (ZENDER, 1800) RUDOLPHI 1810, isolada por FREEMAN em 1962. O antígeno constituiu-se de fluido vesicular e proteínas solúveis de membrana, as quais foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos SWISS. Após 90 dias, os

animais foram eutanasiados e os cisticercos recolhidos, processados, congelados, liofilizados e armazenados em câmara fria.

3.3.2 *Cysticercus bovis*

Fragmentos de carne bovina, de diferentes posições anatômicas, contendo cisticercos de tamanhos variáveis de animais infectados naturalmente, foram coletados em matadouro/frigorífico da região metropolitana de Curitiba e armazenados e transportados em PBS pH 7,4, em tubos de 50 mL, em recipiente com gelo. Em laboratório, os cisticercos foram confirmados como *C. bovis* por compressão entre lâminas e verificação da ausência de rostro e acúleos. Em seguida foram dissecados com o auxílio de um bisturi.

Para obtenção do antígeno aqui denominado de escólex, os cisticercos tiveram suas cápsulas externas perfuradas com haste de metal pontiaguda, para que o escólex desenvaginasse e pudesse ser recuperado. Em PBS pH 7,4 e na presença do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), os vermes foram triturados (em graal e com auxílio de pistilo) e o material submetido ao ultrassom por 5 ciclos de 40 hertz por 10 segundos cada um e com um minuto de repouso em banho de gelo. Posteriormente o material foi centrifugado a 7.500 g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). Os mesmos procedimentos de trituração, sonicação, centrifugação e dosagem de proteínas foram usados para a preparação do antígeno morto, feito com cisticercos visivelmente calcificados.

Para obtenção do antígeno denominado de PECi – proteínas de secreção/excreção foram obtidas por choque térmico, como descrito: depois dos vermes serem dissecados da musculatura bovina, aproximadamente 8 cistos eram armazenados em microtubos de 1,5 mL com o dobro do seu volume de PBS pH 7,4 e PMSF. O material permaneceu por 5 minutos em gelo e depois, por mais 5 minutos, em água quente (35°C – 40°C). O ciclo se repetiu por 5 vezes. As proteínas solúveis foram separadas dos cisticercos, dosadas e armazenada em freezer.

3.4 ELISA

Todos os soros bovinos foram avaliados quanto ao título de anticorpos por teste ELISA indireto. A realização da técnica seguiu a padronização proposta pela equipe de Minozzo (2004) ao se utilizar o antígeno heterólogo de *Cysticercus longicollis*.

Resumidamente, a placa foi sensibilizada com 10 µg/mL do antígeno de *C. longicollis* diluído em solução de tampão carbonato pH 9,6 e incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, após duas lavagens com solução de lavagem (PBS-T 0,05%), a placa foi bloqueada com tampão de bloqueio (caseína 2%) e incubada por 1 hora em estufa a 37°C. Após duas lavagens, os soros diluídos 1:100 foram incubados. A placa permaneceu por 1 hora em estufa a 37°C. Após quatro lavagens para retirada das imunoglobulinas não ligadas ao antígeno, o conjugado anti-IgG bovina peroxidase (Sigma) na diluição 1:5000 foi adicionado. A placa foi incubada por mais 1 hora em estufa a 37°C. Depois de seis lavagens, o substrato (tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno orto-fenildiamina - OPD) foi adicionado e a placa foi incubada no escuro por 15 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 5% (diluição 1:20), e os títulos dos anticorpos foram determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490nm por um leitor de ELISA *Bio-Rad* 550 (MINOZZO et al., 2004).

3.5 OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS TOTAIS (Ig)

A partir dos resultados de absorbâncias obtidas no teste ELISA, os soros dos animais que apresentaram maior reatividade foram reunidos em um *pool* de soros, que foi tratado com uma solução saturada de sulfato de amônio para precipitação das imunoglobulinas totais.

A extração das Igs foi feita utilizando-se o protocolo descrito por Harlow e Lane (1988). Resumidamente: o *pool* de soros mais reativos para cisticercose bovina foi centrifugado a 2.160 g, por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante e sob leve agitação em agitador magnético em banho de gelo, foi adicionada, gota a gota, a solução de sulfato

de amônio. A solução foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o pelete formado foi diluído em volume igual em PBS pH 7,4.

A solução contendo as Igs foi dialisada em membrana de celulose previamente fervida, contra PBS pH 7,4 a 4°C, *overnight*, para completa retirada do sulfato de amônio. Após a diálise, a solução foi estocada a -20°C, para posterior purificação.

3.6 OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS G (IgG) A PARTIR DAS Ig TOTAIS

Com o objetivo de separar as imunoglobulinas G das demais, uma coluna de cromatografia de afinidade foi utilizada de acordo com o protocolo do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech – 1993), contendo Proteína G – *Sepharose*® (Sigma). A solução das Igs foi eluída através da coluna, com o propósito de se obter anticorpos cuja porção Fc reconhecesse a molécula da proteína G fixada na resina.

3.6.1 COLUNA DE AFINIDADE

A montagem da coluna de afinidade Proteína G-*Sepharose*®, foi realizada como segue: em uma coluna de plástico descartável de 10 mL, foi colocado lã de vidro, com a finalidade de evitar que o material escoasse rapidamente, e aproximadamente 1 mL de Proteína G (Sigma). Dois mililitros de Igs precipitadas por sulfato de amônio foi adicionado. O material permaneceu por 1 hora homogeneizando em temperatura ambiente, e em seguida ficou *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, parte do homogenato foi recolhido e estocado a -20°C. Aproximadamente 150 µL das IgG permaneceram em contato com a Proteína G. Para eliminar toda substância inespecífica, a coluna foi lavada com PBS pH 7,4 com aproximadamente 20 vezes o volume da coluna.

A ligação entre o antígeno (Proteína G) e os anticorpos (IgGs) foi desfeita pela eluição por diferença de pH, com glicina 0,1M/NaCl 0,15M pH 2,8. Após a mudança de pH, as IgGs foram recolhidas em alíquotas e neutralizadas com Tris/HCl 1M pH 9,0.

Para a completa retirada da glicina, as alíquotas foram colocadas em membranas de celulose e dialisadas contra PBS pH 7,4, *overnight*, sob agitação, a 4°C.

Após o término da diálise, a solução contendo os anticorpos foi novamente aliquotada e armazenada em temperatura de congelamento.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO

Para que fosse possível a caracterização do perfil da reatividade das IgGs bovinas frente aos diferentes extratos de *C. bovis*, utilizou-se a técnica de *Western Blotting*.

3.7.1 SDS-PAGE

O extrato foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) unidimensional a 10%. As amostras contendo 5 e 40 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (0,5M Tris/HCl, SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 10%) em presença do agente redutor beta-mercaptoetanol na proporção de 4:1, e aquecida a 100°C por três minutos. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,2M e SDS 0,5%, pH 8,3), em cuba de acrílico (Permatron), sob uma corrente de 150 V. Parte do gel foi separado e corado por nitrato de prata, como descrito abaixo.

O gel foi lavado com água destilada por 5 minutos, fixado com metanol 50% por 20 minutos e lavado por mais 10 minutos com água destilada. Depois, foi fixado com glutaraldeído 25% por 30 minutos, e lavado com água por 4 vezes por 10 minutos. Para corar as proteínas, uma solução de nitrato de prata 1% foi preparada, adicionando-se 53% de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,36% e 3,5% de Hidróxido de amônio. O gel foi corado por 20 minutos, no escuro e lavado duas vezes com água por 5 minutos. Para revelação, o gel foi incubado com uma solução de água destilada contendo 0,25% de ácido acético e 0,1% de formaldeído. Para parar a reação, uma solução *stop* de ácido acético 1% foi adicionada por 20 minutos.

3.7.2 ELETROTRANSFERÊNCIA

O gel contendo 40 µg de proteína/canaleta do escólex foi eletrotransferido para membrana de PVDF 0,2 µm (MILLIPORE), a uma corrente de 24 V *overnight* e 48 V por uma hora e/ou a 100 V por 1 hora em tampão de transferência com pH 8,3 contendo glicina 0,2 M, Tris 0,025 M e metanol 20%.

3.7.3 IMMUNOBLOTTING

Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi certificada mergulhando-se a membrana em solução de Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético, por 30 minutos. Para visualização das bandas, a membrana foi mergulhada em metanol. O padrão de massa molecular (Invitrogen) foi cortado e seco sob papel filtro em temperatura ambiente. A membrana restante foi submetida aos procedimentos descritos.

A membrana foi lavada com PBS-Tween (PBS-T) 0,05% por três vezes por 5 minutos e bloqueada com PBS-T 0,3%, por 1 hora, sob agitação e a temperatura ambiente. Depois, foi lavada com PBS-T 0,05% por três vezes de 5 minutos, para ser incubada por 2 horas com IgGs totais diluídas 1:2000 em PBS pH 7,4 em temperatura ambiente. A membrana foi lavagem com PBS-T 0,05% por três vezes de 5 minutos para retirada dos anticorpos não ligados. Como segundo anticorpo, foi utilizado soro de cabra anti-IgG bovina conjugada à peroxidase (Sigma) na diluição 1:5000 por 1 hora. Após quatro lavagens, sendo as duas primeiras com PBS-T 0,05% e as duas últimas com PBS, a presença da peroxidase foi revelada com uma solução de PBS contendo 0,025% de cloronaftol diluído em 1,66 mL de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H₂O₂ 0,04%.

3.8 PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICAS ANTI-*Cysticercus bovis*

Como primeiro antígeno a ser testado, o ESCÓLEX teve suas bandas separadas por um gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF. Após o bloqueio, e três lavagens com PBS-T 0,05% por 5 minutos, as IgGs totais foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, e *overnight* a 4°C. Após cinco lavagens de 5 minutos com PBS-T 0,05%, as imunoglobulinas que reconheceram o antígeno foram eluídas por diferença de pH (glicina 0,1 M/NaCl 0,15 M pH2,8). As IgGs específicas anti-*C. bovis* foram neutralizadas (Tris/HCl 1 M pH9,0) e dialisadas contra PBS pH 7,4, *overnight* a 4°C. A dosagem protéica foi realizada diretamente pelo espectrofotômetro GENOVA Jenway em cubeta de quartzo, a 280 nm.

3.9 PHAGE DISPLAY – SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS EXPRESSOS NA SUPERFÍCIE DE FAGOS

A biosseleção dos peptídeos sobre o imunotubo foi realizada como descrito por Villard e colaboradores (2003) com algumas modificações:

3.9.1 SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA

Para o primeiro *panning*, dois imunotubos (NUNC) foram sensibilizados com 5 µg/mL da IgG bovina específica contra *C. bovis* (antígeno escólex) diluídos em 1,5 mL de tampão carbonato (NaHCO₃ 100 mM/L pH8,6) durante 12-16 horas a 4°C. Para o segundo *panning*, utilizou-se 1 µg/mL do anticorpo bovino, e para o terceiro, quarto e quinto *pannings*, 0,5 µg/mL.

3.9.2 BLOQUEIO DA PLACA E INCUBAÇÃO DOS FAGOS – *PANNING* 1

Após a sensibilização, os tubos foram lavados 5 vezes com 3 mL de tampão de lavagem (TBS-Tween 0,05%) por 2 minutos cada, e incubados com 4 mL de uma solução de bloqueio (TBS-T 0,05% + BSA 3%), previamente filtrada a 22 µm, por 2h a 37°C.

Após a retirada do bloqueio, os tubos foram novamente lavados conforme descrito acima e incubados com as bibliotecas durante 12-16 horas a 4°C. Para a primeira seleção, 10×10^{10} TU da biblioteca de peptídeos randômicos lineares de 15 aminoácidos (X_{15}) e de 12 aa (LX8) e 10×10^{11} TU da biblioteca conformacional de 17 aa (X_8CX_8), de 8 aa (LX4) expressos na superfície de proteínas PVIII dos fagos filamentosos foram diluídas em 1,5 mL de TBS-T 0,05% e incubados nos imunotubos, durante 12-16h a 4°C.

As quatro bibliotecas utilizadas no presente trabalho foram descritas por Bonnycastle *et al.* (1996) e foram gentilmente cedidas por J. K. Scott (Simon Fraser University, Burnaby BC, Canada).

3.9.3 OBTENÇÃO DOS FAGOS POR ELUIÇÃO ÁCIDA E POR COMPETIÇÃO

Após a incubação das bibliotecas de fagos, os imunotubos foram lavados por 10 vezes de 2 minutos com TBS-T 0,5% e 5 vezes com TBS-T 0,05%.

3.9.3.1 ELUIÇÃO ÁCIDA

Após as quinze lavagens, os vírus reativos aos anticorpos foram eluídos ao se adicionar 1,5 mL do tampão de eluição (glicina 0,1 mol/L BSA 1 mg/mL, pH 2.2). Passados 30 minutos, transferiu-se o eluato para um microtubo de 2 mL que foi neutralizado com 70 μ L de tampão Tris-HCl 2 mol/L pH 9,0. Uma alíquota de 20 μ L foi guardada a 4°C para posterior titulação parcial realizada em conjunto com a titulação final.

3.9.3.2 ELUIÇÃO POR COMPETIÇÃO

Após as lavagens, os fagos reativos aos anticorpos foram eluídos ao se adicionar 100 vezes a concentração de IgG sensibilizada, de antígeno bruto de *C. bovis* diluídos em 1,5 mL de TBS-T 0,05%. Passados 90 minutos, transferiu-se o eluato para um microtubo de 2 mL. Uma alíquota de 20 μ L também foi guardada a 4°C.

3.9.4 AMPLIFICAÇÃO DOS FAGOS ELUÍDOS

Em uma suspensão de bactérias *Escherichia coli* cepa K91 preparada previamente com a inoculação de uma colônia bacteriana em 10 mL de meio LB, adicionaram-se 1,5 mL do eluato contendo os fagos. As células foram incubadas durante 10 minutos a 37°C sem agitação e posteriormente, adicionadas a 100 mL de meio LB pré-aquecido a 37°C contendo 0,2 µg/mL de tetraciclina. Após 30 minutos de indução a 225 rpm, ajustou-se a concentração de tetraciclina para 20 µg/mL. O crescimento bacteriano ocorreu durante 16 horas a 37°C e sob agitação de 225 rpm.

3.9.5 PRECIPITAÇÃO DOS FAGOS

A cultura de bactérias contendo os fagos amplificados foi colocada em tubo esterelizado de 250 mL e centrifugada a 4°C, a 2.160 g durante 20 minutos. O sobrenadante contendo os fagos foi transferido a um novo tubo, onde foi adicionado 15% de PEG 8000 contendo 20% NaCl 2,5 mol/L. O conteúdo foi misturado por inversão (aproximadamente 100 vezes) e precipitado em gelo, por 16 horas e a 4°C.

O sedimento formado (bactérias) foi ressuscitado em 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e estocado em freezer -80° C com 15% de glicerol.

A solução de precipitação dos fagos foi centrifugada a 4°C, a 12.000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1,5 mL de tampão TBS 50 mmol/L NaCl 150 mmol/L pH 7,5. A solução ficou por 30 minutos a 37°C a 225 rpm para ressuspender o pelete. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 14.500 g por 15 minutos a 4°C para remoção de possíveis restos celulares.

3.9.6 TITULAÇÃO DOS FAGOS

Titulou-se o *pool* de fagos adicionando-se 10 μ L de cada uma das diluições dos fagos (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-4} para a titulação parcial e, 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} para a titulação final), em 200 μ L de bactérias *E. coli* K91 previamente cultivadas. Os microtubos foram incubados por 15 minutos a 37°C sem agitação e por mais 15 minutos a 37°C sob agitação de 225 rpm.

As células foram então plaqueadas em meio LB contendo ágar e 20 μ g/mL de tetraciclina, para contagem das colônias. As placas foram incubadas por 16 horas em estufa a 37°C.

3.9.7 DEMAIS PANNINGS

O mesmo procedimento foi seguido para os *pannings* subseqüentes, com a exceção de que, 2×10^{11} fagos obtidos no *panning* antecedente foram utilizados na incubação com os anticorpos sensibilizados no tubo.

3.9.8 TESTE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS PANNINGS

Utilizou-se o teste ELISA para avaliar a reatividade dos fagos oriundos dos *pannings* I, II, III, IV e V frente às IgGs bovinas anti-*C. bovis*. Cada eluato constituiu-se de um *pool* de fagos. Fagos silvestres (sem o inserto que codifica sequências peptídicas no capsídeo) foram utilizados como controle negativo.

Para o teste, uma placa flexível de 96 poços (Falcon) com fundo em U foi sensibilizada com 10 μ g/mL do antígeno escólex de *C. bovis* em tampão carbonato pH 8.6, durante 16 horas a 4°C. A placa foi lavada por 2 vezes com solução de lavagem e bloqueada com caseína 2% por 1 hora, a 37°C. Depois de 2 lavagens, a placa foi incubada por 2 horas com o *pool* de fagos de cada *panning*, na concentração de 10^9 TU/mL. Todas as avaliações foram feitas em triplicata. Depois de lavar a placa por 4 vezes, o anticorpo de coelho anti-M13 (Sigma) na diluição 1:1000 foi incubado por 1 hora a 37°C. Por fim, depois de 4 lavagens, o conjugado anti-coelho HRP (Sigma) na diluição

1:4000 foi adicionado. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente foi feita a revelação utilizando-se o tampão substrato. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 20 µL de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em 490nm.

3.10 SELEÇÃO E PRECIPITAÇÃO DOS CLONES

Os *pannings* mais imunoreativos foram escolhidos e a titulação foi realizada conforme descrito, com a diferença de se utilizar placas de Petri (140 x 15mm) para obtenção de colônias bem isoladas.

Depois do crescimento, as colônias foram pinçadas com palitos esterilizados e foram colocadas em tubos de 50 mL com 10 mL de meio LB e 20 µg/ml de tetraciclina. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação de 225 rpm durante 16 horas.

No dia seguinte, os tubos contendo o material foram centrifugados a 4°C, a 2.160 g durante 20 minutos para retirada do pelete bacteriano, que foi ressuspenso em 1 mL de meio LB e estocado em freezer com 15% de glicerol. O sobrenadante contendo os fagos foi precipitado com PEG 8000 contendo 20% NaCl 2,5 mol/L por inversão e ficaram *overnight* em gelo a 4°C.

Depois, os tubos foram centrifugados em temperatura de 4°C, a 12000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de PBS-T 0,05% para recuperação dos fagos.

Cada fago foi testado por teste ELISA com IgG anti-*C. bovis*, seguindo-se o protocolo descrito no item 3.9.8. Os fagos que apresentaram maior reatividade foram selecionados para serem testados com o *pool* de soros bovinos de alto título e com o *pool* negativo, para então terem seus DNAs extraídos e sequenciados.

3.10.1 PRECIPITAÇÃO DO DNA VIRAL

Para a precipitação de DNA utilizou-se o protocolo proposto pelo fabricante (kit Qiagen® 27704 – QIAprep spin M13), com modificações.

3.10.2 CRESCIMENTO BACTERIANO E PRECIPITAÇÃO DO DNA

As bactérias infectadas com os fagos foram cultivadas em 10 mL de meio LB, por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 225 rpm.

Depois de centrifugados a 3380 g por 20 minutos, para a retirada do pelete bacteriano, 5 mL do sobrenadante contendo fagos foram transferidos para um tubo esterilizado. Foram adicionados 500 µL do tampão MP (10 µL para cada mL da solução de fagos), homogeneizado e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos.

3.10.3 OBTENÇÃO DO DNA

Setecentos microlitros da solução precipitada foram transferidos para uma coluna e centrifugados por 12.000 g durante 15 segundos. As centrifugações foram repetidas até que os 5 mL fossem filtrados.

A seguir, adicionaram-se à coluna 700 µL do tampão MLB que foi centrifugado a 12.000 g por 15 segundos. Descartado o filtrado, o tampão MLB foi novamente adicionado à coluna e incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, para completa lise dos bacteriófagos. O microtubo contendo a coluna foi novamente centrifugado.

Posteriormente, foram adicionados 700µL de tampão de lavagem. As colunas foram centrifugadas. Repetiu-se a centrifugação mais uma vez para certificar a retirada total do tampão.

A parte superior da coluna foi encaixada em microtubo de 1,5 mL esterilizado, e foram adicionados 100 µL de água ultrapura esterilizada previamente aquecida a 50°C. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-Maria (50°C) e, posteriormente, centrifugados por 30 segundos a 12.000 g.

A parte superior da coluna foi removida e descartada. A concentração dos ácidos nucléicos foi dosada pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), aliqotado e congelado a -20° C.

3.11 SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS

3.11.1 REAÇÃO DE SEQUECIAMENTO

A reação de seqüenciamento foi realizada com 100 ng de DNA de cada clone em volume final de 10 µL, contendo 1 µL de Big Dye, 1 µL de tampão e 1,6 pmol do primer reverso 5' TCG GCA AGC TCT TTT AGG 3'. As condições do seqüenciamento foram: 1 minuto à 96°C para desnaturação do DNA seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão final a 60°C por 4 minutos.

3.11.1.1 PURIFICAÇÃO DO DNA

Foram adicionados 40 µL de isopropanol 75% ao microtubo, o qual foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 19.500 g por 25 minutos. O isopropanol foi removido por inversão em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70%, centrifugado a 19.500 g por 5 minutos. O etanol foi removido, o tubo foi secado em estufa (37°C) e armazenado a -20°C.

3.11.2 ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO

A análise das sequências de DNA provenientes do seqüenciador automático *Applied Biosystems* 3130 foi processada em software do próprio equipamento. Logo após esta pré-análise, os cromatogramas foram traduzidos.

As sequências geradas foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis *online*.

Pelo *BioEdit*, os cromatogramas foram avaliados quanto à presença da sequência "CCTTCTGCAGC", local anterior ao início do inserto aleatório no DNA viral. O final deste inserto está posicionado anteriormente à sequência "GGCAAA".

Para o resultado da tradução, utilizou-se o programa de tradução (*Proteomics*) disponível no endereço www.expasy.ch, mais precisamente a opção *Tools – DNA-Proteins – Translate*, leitura de tradução de proteína 3'→5', utilizando-se a primeira janela de leitura (*frame 1*).

3.11.2.1 ANÁLISE DA IDENTIDADE COM OUTRAS SEQUÊNCIAS

As seqüências dos clones selecionados foram analisadas quanto à sua identidade com outras seqüências registradas em bancos de dados através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.12 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS DE CELULOSE

As primeiras seqüências peptídicas obtidas foram sintetizadas sobre uma membrana de celulose pelo método de *Spot synthesis* (FRANCK, 1992) pelo sintetizador automático ResPep SL (Intavis AG – *Bioanalytical Instruments*).

A técnica do ALA (alanina) *scan* foi utilizada para avaliação dos aminoácidos essenciais para o reconhecimento da proteína pelos anticorpos.

3.12.1 IMUNOENSAIOS DOS PEPTÍDEOS

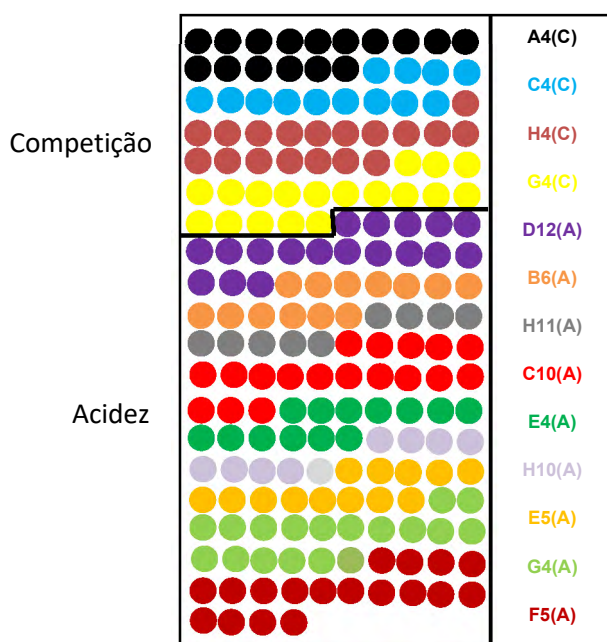
Após a síntese dos primeiros peptídeos obtidos (A4, C4, H4 e G4 do quinto *panning* da eluição por competição e D12, B6, H11, C10, E4, H10, E5, G4 e F5 do primeiro *panning* da eluição por acidez) sobre a membrana (FIGURA 4) para a verificação da reatividade em relação às amostras de soro de bovinos com altos títulos e negativos para cisticercose, os ensaios foram realizados como descrito:

A membrana foi lavada por três vezes por 10 minutos com TBS pH 7,0 e incubada *overnight* com solução de bloqueio em TBS-T 0,1% e BSA 3%. Após o bloqueio, a membrana foi lavada e incubada com os *pools* 1:2000 por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, três lavagens foram realizadas como descrito e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma) foi diluído 1:30000, adicionado

e mantido sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Foram realizadas mais duas lavagens com TBS-T por 10 minutos e outra subsequente com TBS. Após a última lavagem, a reação foi revelada utilizando o kit ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE *Healthcare*). O filme foi exposto por 1 minuto à membrana e revelado utilizando as soluções de revelação e fixação comercializadas pela Kodak.

Após ser documentada, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. A membrana foi tratada com uréia 8M, 1% de SDS, 0,1% de 2-mercaptoetanol, depois com etanol 50% e ácido acético 10%, e por fim, com metanol para remoção dos complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos, por três vezes por 10 minutos cada. Este procedimento permite a reutilização das membranas por cerca de 30 a 40 vezes para o emprego de anticorpos policlonais e de até 70 vezes para anticorpos monoclonais (FUMAGALLI, 2008).

FIGURA 4 – Disposição dos peptídeos sintetizados sobre a membrana. (C) significa que os fagos que deram origem à sequência foram eluídos por competição. (A) significa que os fagos que deram origem à sequência foram eluídos por acidez.



4. RESULTADOS

4.1 TESTES ELISA PARA SELEÇÃO DE SOROS

Dos 1057 soros de bovinos comprovadamente infectados com ovos de *T. saginata*, 120 foram selecionados por teste ELISA indireto de acordo com os elevados títulos de anticorpos contra cisticercose bovina, utilizando-se o antígeno heterólogo derivado de *C. longicollis* (MINOZZO et al., 2004). Os soros escolhidos tiveram absorbância, no mínimo, três vezes superior ao *cut off* (0,209), ou seja, valores entre 0,689 e 1,702. Dos soros selecionados foi feito um *pool* que totalizou 17 mL.

Cinco soros negativos constituíram-se do *pool* negativo.

4.2 PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS BOVINAS

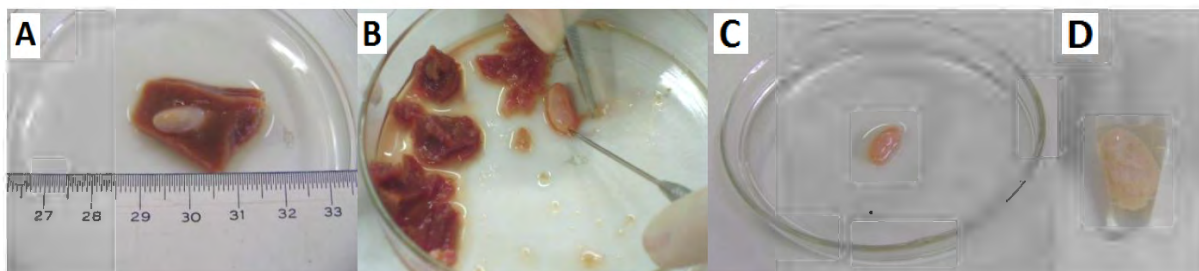
Por dosagem direta em espectrofotômetro, as imunoglobulinas bovinas obtiveram a concentração protéica de 0,57 mg/mL.

4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO *Cysticercus bovis*

Os antígenos solúveis de *C. bovis* foram obtidos de cisticercos recolhidos de carne bovina infectada naturalmente (FIGURA 5).

Para uma análise preliminar, diferentes extratos do cisto foram avaliados. Na TABELA 6, segue a concentração protéica dos antígenos produzidos. O perfil protéico dos extratos preparados encontra-se na FIGURA 6. O perfil protéico das proteínas de excreção/secreção, escólex e cisticerco calcificado, apresentam respectivamente 34, 28 e 25 bandas nítidas.

FIGURA 5 – Processamento do *Cysticercus bovis* em laboratório para obtenção de antígeno. A) *C. bovis* na musculatura bovina; B) dissecação do cisto – retirada da carne com auxílio de bisturi, pinça e agulha; C) cisto em PBS; D) cisto armazenado em microtubo com PBS para posterior trituração, sonicação e dosagem protéica.



Fonte: Autor (2009).

TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS DE *Cysticercus bovis*.

Antígeno	Sigla	Concentração Protéica
Proteína de excreção/secreção da carne	PECa	22,4 mg/mL
Proteína de excreção/secreção do cisticerco	PECi	2,7 mg/mL
Escólex do cisto	V	2,3 mg/mL
Cisto calcificado – morto	M	4,4 mg/mL

4.4 WESTERN BLOTTING

O perfil de reconhecimento das bandas no WB (FIGURA 7) foi distinto para cada amostra antígeno analisada, contudo, verificou-se que poucas proteínas do metacestódeo são imunogênicas e que, além disso, houve menor antigenicidade das proteínas do cisticerco vivo (escólex) comparado à reatividade de PECi e de proteínas do cisticerco calcificado.

Quando em contato com anticorpos de coelho imunizado com antígeno bruto de *C. bovis*, as proteínas do escólex do parasito mostraram-se imunogênicas e antígenicas quando comparadas com as do PECi e do cisticerco calcificado (FIGURA 8).

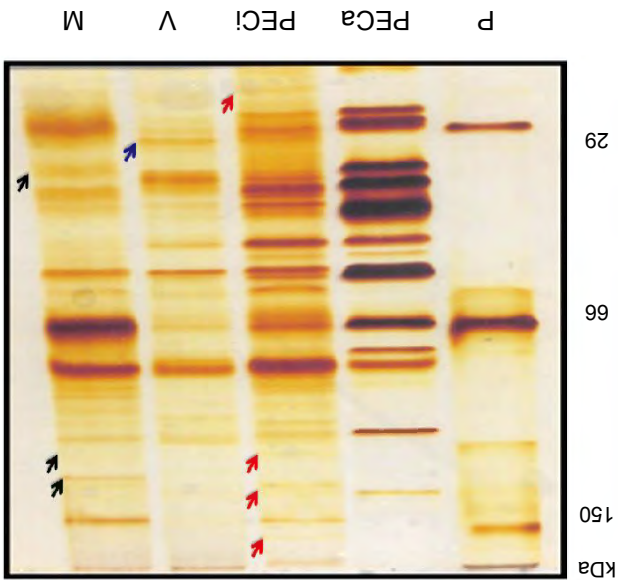


FIGURA 6 – Perfil protéico dos diferentes extratos de *Cysticercus bovis*. P: Padrão de massa molecular; PECa: proteína de excreção/secreção da Carne; PECi: proteína de excreção/secreção do cisticerco; V: escólex do cisticerco; e M: cisticerco calcificado – morto. As setas sugerem as diferenças entre os antígenos.

FIGURA 7 – Perfil de reconhecimento dos antígenos pelas IgG's bovinas. P: Padrão de massa molecular; PECi: proteína de excreção/secreção do cisticerco; V: escólex do cisticerco; e M: cisticerco calcificado – morto.

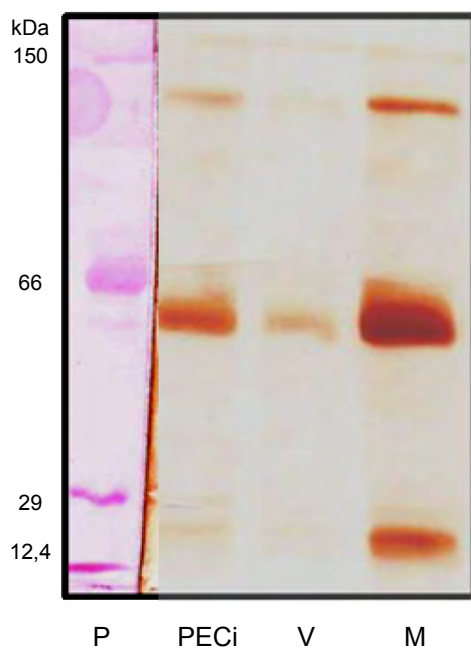
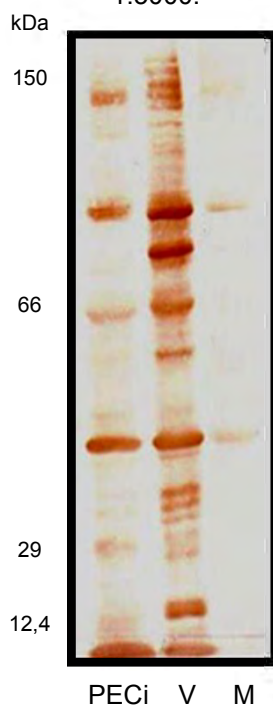


FIGURA 8 – Perfil de reconhecimento dos anticorpos de coelho imunizado com antígeno bruto de *Cysticercus bovis* em WB. PECi: proteína de excreção/secreção do cisticerco; V: escólex do cisticerco; e M: cisticerco calcificado – morto. Soro na diluição 1:300. Conjugado anti-coelho HRP (Sigma) na diluição 1:5000.



4.5 IgGs ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX

Os anticorpos que se ligaram às proteínas do escólex, foram eluídos por modificação de pH e recuperados. A concentração protéica foi de 108 µg/mL.

4.6 PHAGE DISPLAY

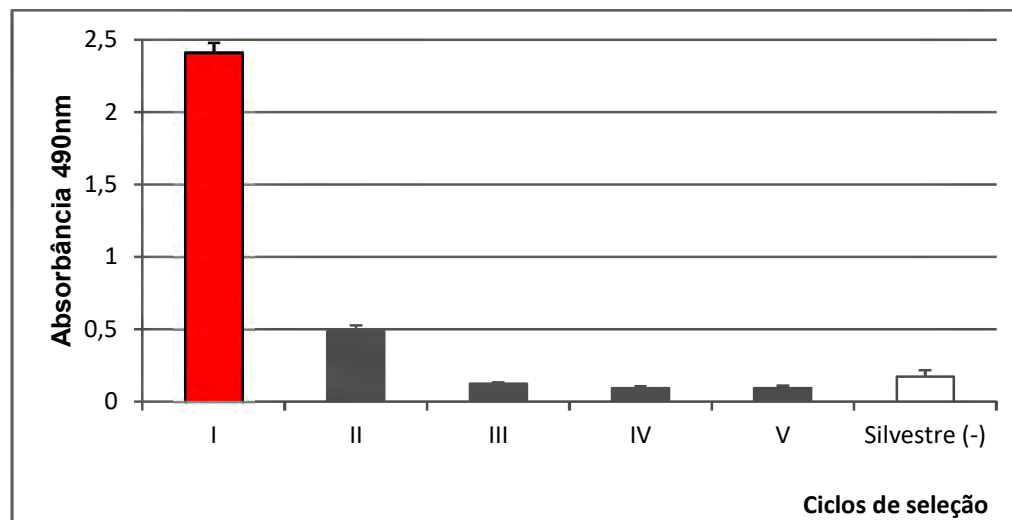
A pesquisa de IgGs específicas por testes ELISA mostrou que o primeiro *panning* realizado por eluição ácida (A1) (GRÁFICO 1) e o quinto *panning* da eluição por competição (C5) (GRÁFICO 2) foram capazes de detectar sequências aminoacídicas reativas a IgGs anti-escólex.

Após as seleções, verificou-se o aumento da reatividade das partículas virais frente as IgGs específicas (FIGURA 9).

A quantidade de fagos incubados e os títulos obtidos na titulação parcial (FIGURA 10) são mostrados na TABELA 7. O número de fagos eluídos foi sempre menor que a quantidade incubada.

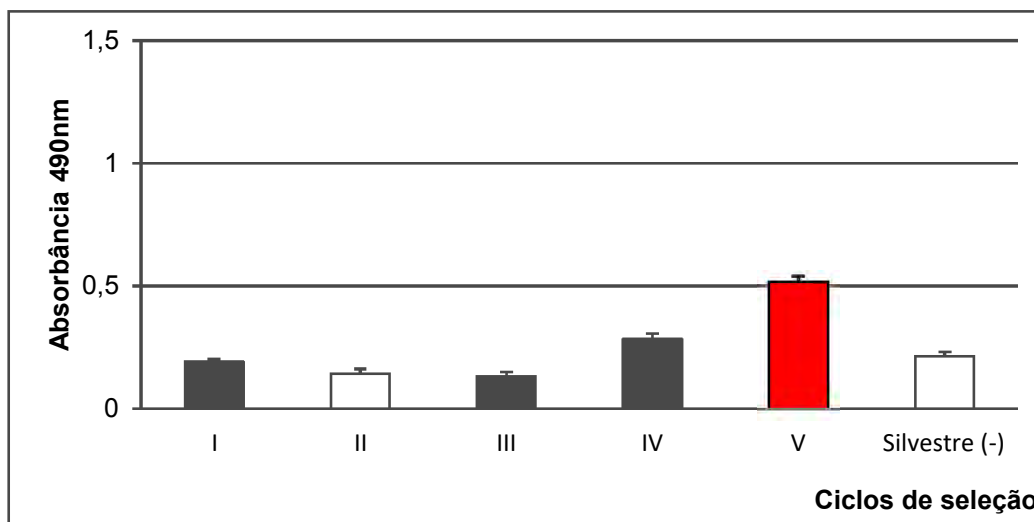
Os *pools* de fagos da eluição por acidez e por competição foram capazes de diferenciar os soros bovinos de alto título contra cisticercos e os negativos. As absorvâncias do soro de alto título foram de 0,801 para o *pool* de fagos eluídos por acidez (A) e 0,622 para o *pool* de fagos eluídos por competição (C), enquanto a do negativo foi de 0,290 para A e 0,200 para C (GRÁFICO 3). Também foi possível observar que os *pools* de fagos foram capazes de diferenciar dois soros bovinos aleatórios (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 1 – REATIVIDADE DOS FAGOS ELUÍDOS POR ACIDEZ FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX.



Após 5 ciclos de seleção, 10^9 TU de fagos de cada eluato obtido pela eluição por acidez foram testados com $10\mu\text{g/mL}$ de IgGs específicas anti-*C. bovis* imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de coelho anti-M13 (Sigma) e o conjugado anti-coelho HRP (Sigma). I, II, III, IV e V significam o número do *panning* (ou ciclo de seleção).

GRÁFICO 2 – REATIVIDADE DOS FAGOS ELUÍDOS POR COMPETIÇÃO FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-ESCÓLEX.



Enriquecimento da ligação de fagos após 5 ciclos de seleção. 10^9 TU de fagos de cada eluato obtido pela eluição por competição foram testados com $10\mu\text{g/mL}$ de IgGs específicas anti-*C. bovis* imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de coelho anti-M13 (Sigma) e o conjugado anti-coelho HRP (Sigma). I, II, III, IV e V significam o número do *panning* (ou ciclo de seleção).

FIGURA 9 – Evolução da afinidade dos fagos, eluídos por competição, com as IgGs anti-*Cysticercus bovis*, nos *pannings* I, II, III, IV e V avaliados por ELISA.

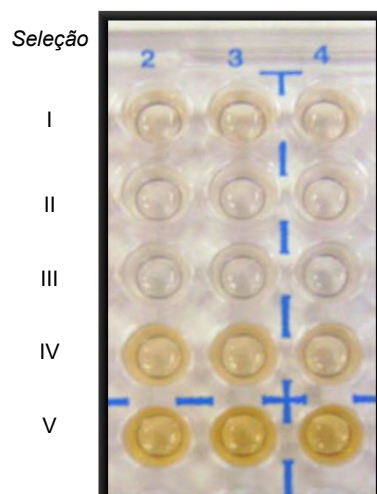


FIGURA 10 – Titulação de fagos. As colônias esbranquiçadas (destaque) representam a infecção das *Escherichia coli* com os fagos que lhes conferem resistência a tetraciclina contida no meio LB.

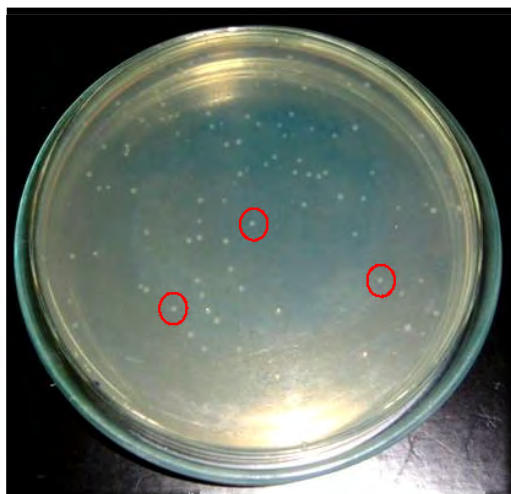
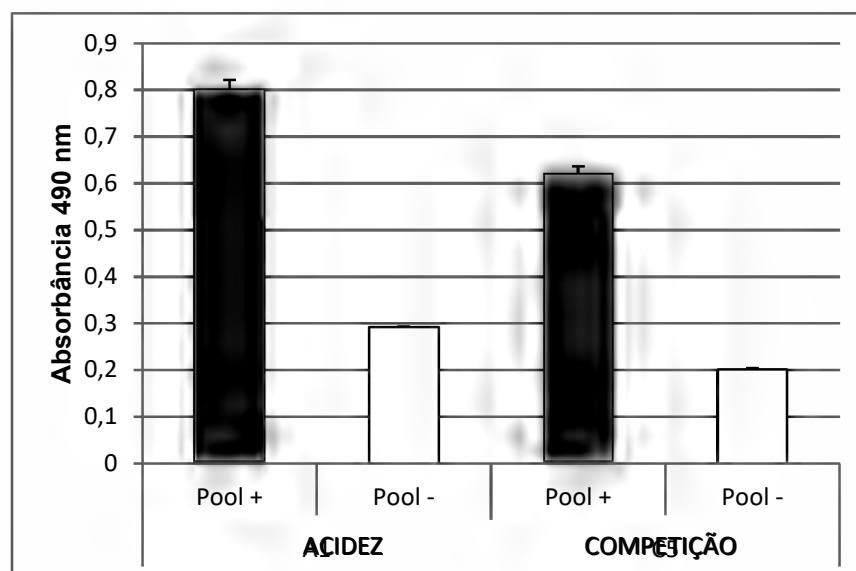


TABELA 7 – SELEÇÃO DOS FAGOS COM PEPTÍDEOS LIGANTES DE ANTICORPOS ANTI-*Cysticercus bovis*.

Cystobacteras deinde.				
Seleção	Eluição por Acidez		Eluição por Competição	
	Número de fagos			
	Incubação	Parcial	Incubação	Parcial
1 ^a	X ₁₅ :1x10 ¹⁰	1x10 ⁴	X ₁₅ :1x10 ¹⁰	7,1x10 ³
	LX8: 1x10 ¹⁰		LX8: 1x10 ¹⁰	
	X ₈ CX ₈ :1x10 ¹¹		X ₈ CX ₈ :1x10 ¹¹	
	LX4: 1x10 ¹¹		LX4: 1x10 ¹¹	
2 ^a	2x10 ¹¹	9,1x10 ³	2x10 ¹¹	1x10 ⁴
3 ^a	2x10 ¹¹	1,5x10 ³	2x10 ¹¹	7x10 ⁴
4 ^a	2x10 ¹¹	2x10 ⁴	2x10 ¹¹	9x10 ²
5 ^a	2x10 ¹¹	2x10 ⁴	2x10 ¹¹	5x10 ²

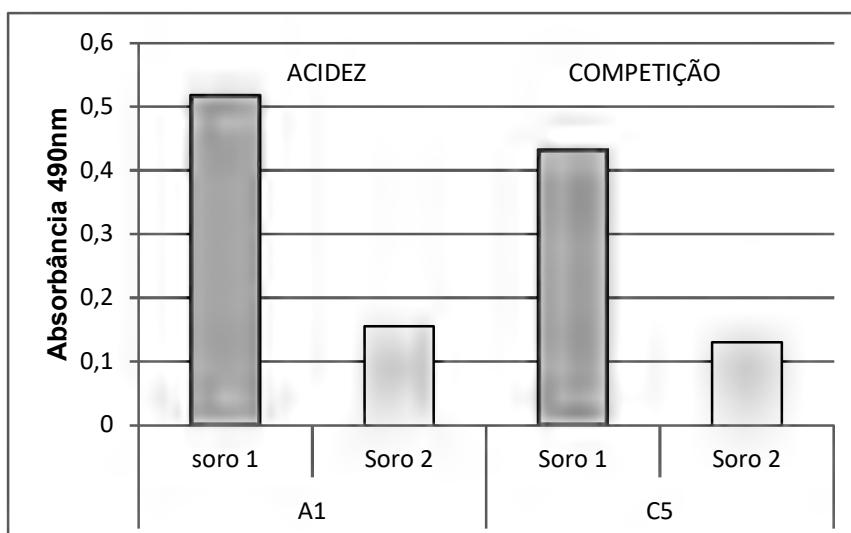
Títulos de incubação e da titulação parcial realizada após as eluições por acidez e por competição. A partir da 2^a seleção são incubados 2x10¹¹ fagos obtidos na seleção anterior. A titulação parcial é realizada após a eluição dos fagos que se ligaram nos anticorpos imobilizados no tubo.

GRÁFICO 3 – FAGOS ELUÍDOS POR ACIDEZ E POR COMPETIÇÃO DIFERENCIAM POOLS DE SOROS BOVINOS.



Foram testados 10^9 TU de fagos de cada eluato obtidos pelas eluições com soros bovinos diluídos 1:100. A ligação foi detectada adicionando-se o conjugado anti-bovino HRP (Sigma).

GRÁFICO 4 – POOLS DE FAGOS ELUIDOS POR ACIDEZ E POR COMPETIÇÃO FORAM CAPAZES DE DIFERENCIAR DOIS SOROS BOVINOS ALEATÓRIOS.



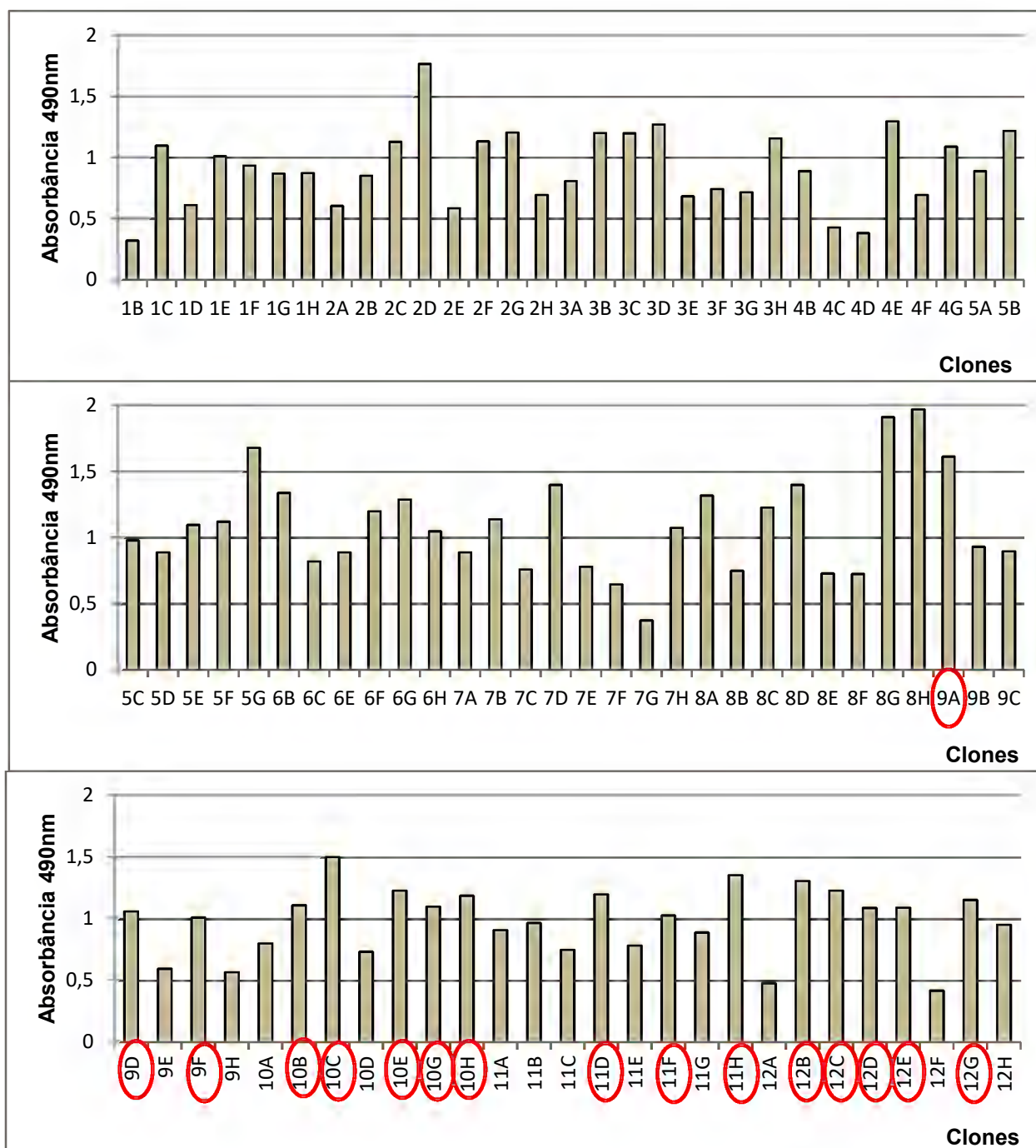
Foram testados 10^9 TU de fagos de cada eluato obtidos pelas eluições com soros aleatórios diluídos 1:100. A ligação foi detectada adicionando-se o conjugado anti-bovino HRP (Sigma). O teste foi realizado em duplicata.

4.7 SELEÇÃO DOS CLONES

Após o crescimento individual de 85 clones obtidos por eluição por acidez e de 48 da eluição por competição, foram feitos testes ELISA para avaliar a reatividade frente as IgGs bovinas específicas anti-*C. bovis* (GRÁFICOS 5 e 6). Para os fagos eluídos por acidez, 44 clones foram selecionados, e para os fagos eluídos por competição, 24. Os clones selecionados estão em destaque nos gráficos.

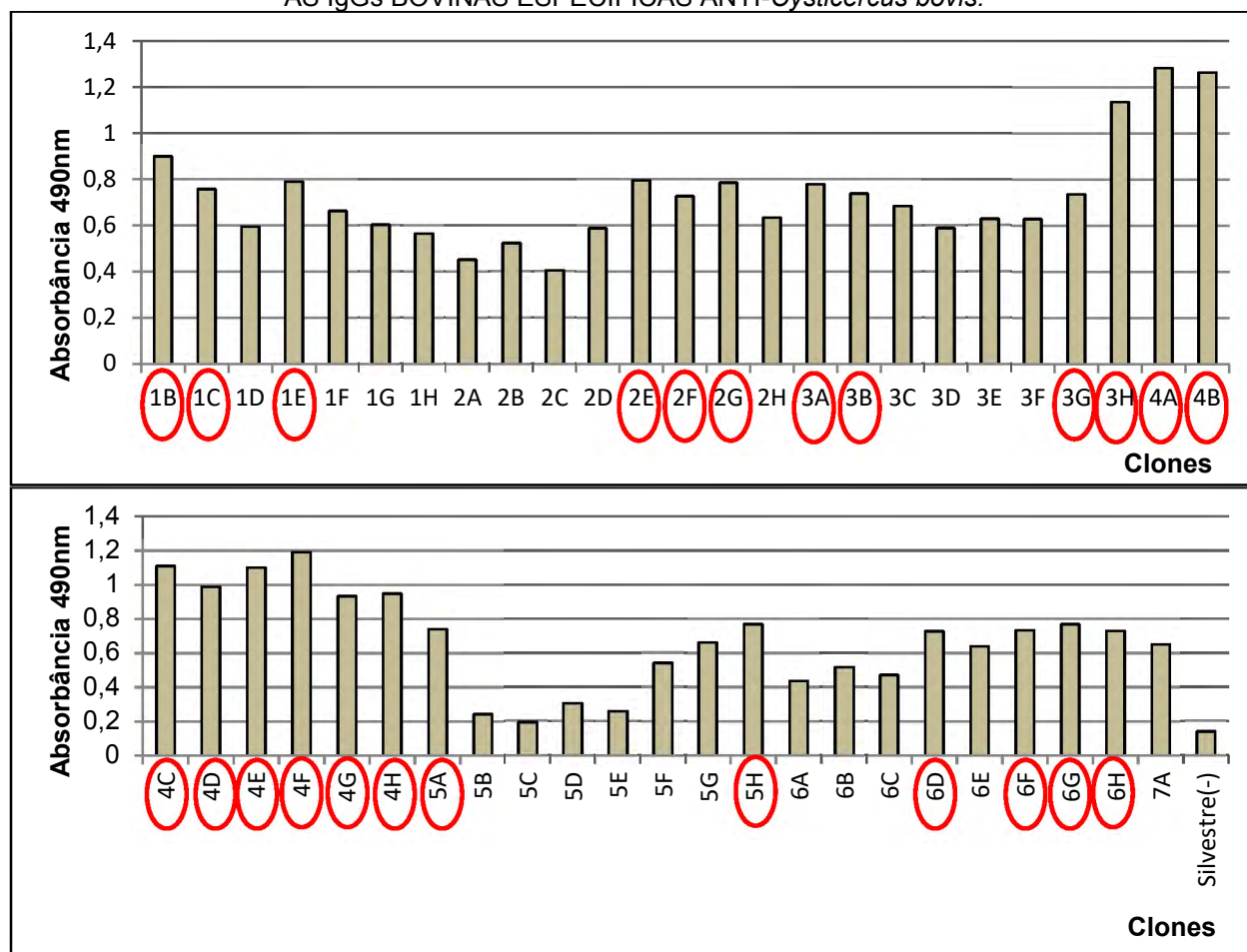
Os clones pré-selecionados foram testados com os *pools* de soros bovinos de alto título e negativo (GRÁFICOS 7 e 8). Dos fagos eluídos por acidez, 25 clones foram pré-selecionados seguindo os critérios de apresentarem absorbância (A) do *pool* positivo maior (>) que 1 e com diferença entre soros positivo e negativo > 0,5; absorbância do *pool* positivo > 0,9 e com diferença entre soros positivo e negativo \geq 0,5; absorbância do *pool* positivo menor (<) que 0,9 e com o negativo \leq a 0,5. Os clones selecionados estão em destaque nos gráficos. Os 24 clones da eluição por competição foram selecionados porque apresentaram absorbâncias semelhantes.

GRÁFICO 5 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS CLONES ELUÍDOS POR ACIDEZ FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-*Cysticercus bovis*.



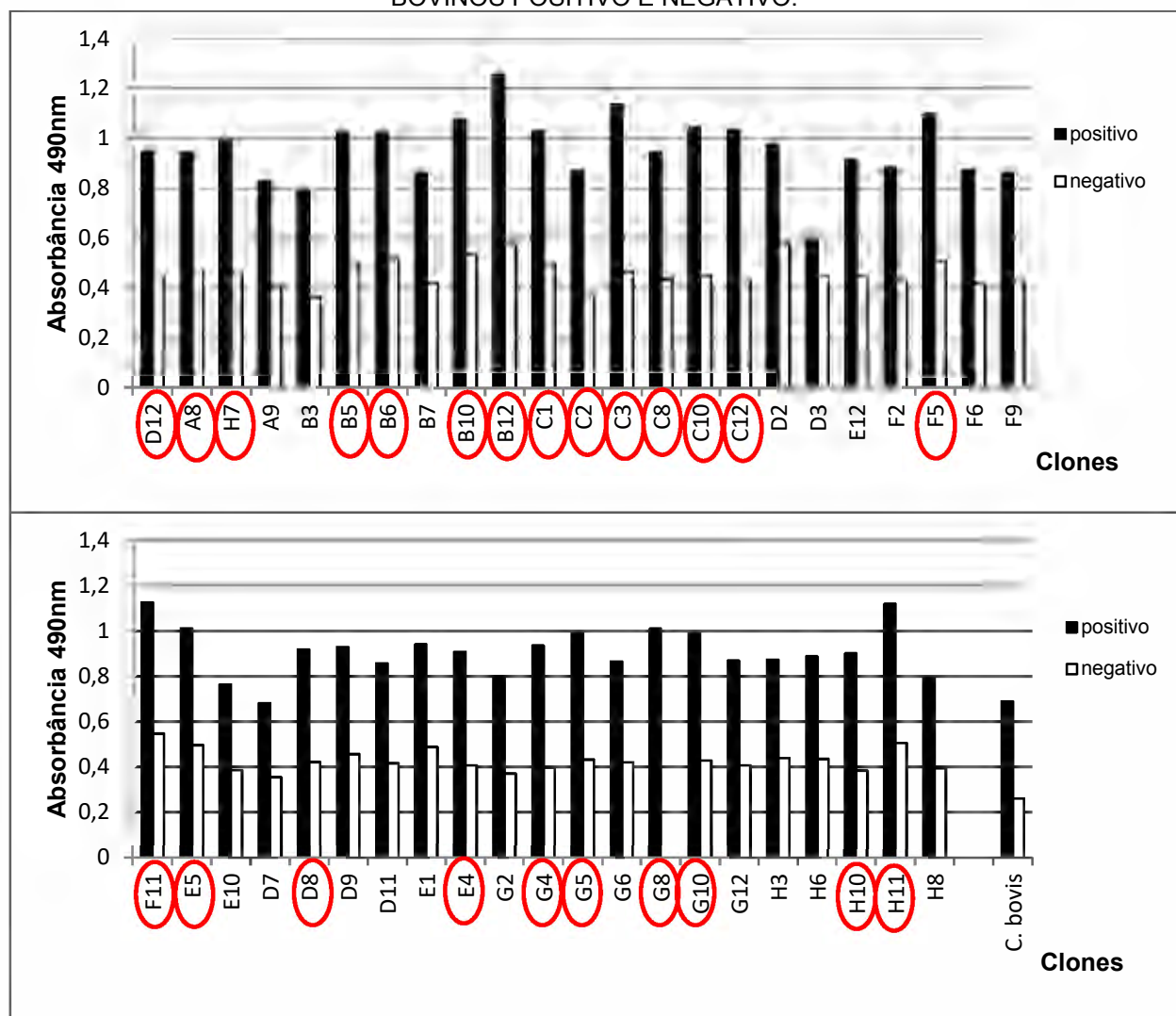
Vinte microlitros do sobrenadante celular contendo fagos foram testados com 10µg/mL de IgGs específicas anti-*C. bovis* imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de coelho anti-M13 (Sigma) e o conjugado anti-coelho HRP (Sigma).

GRÁFICO 6: AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS CLONES ELUÍDOS POR COMPETIÇÃO FRENTE AS IgGs BOVINAS ESPECÍFICAS ANTI-*Cysticercus bovis*.



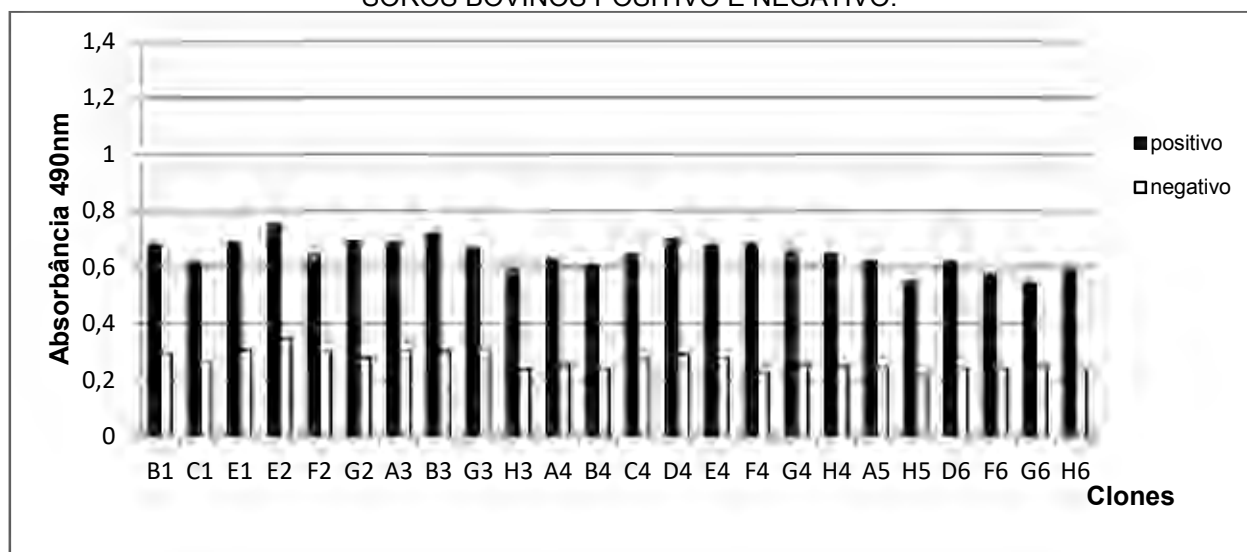
Vinte microlitros do sobrenadante celular contendo fagos foram testados com 10µg/mL de IgGs específicas anti-*C. bovis* imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de coelho anti-M13 (Sigma) e o conjugado anti-coelho HRP (Sigma).

GRÁFICO 7 – REATIVIDADE DOS CLONES ELUÍDOS POR ACIDEZ FRENTE AO POOL DE SOROS BOVINOS POSITIVO E NEGATIVO.



Os pools de soros de bovinos foram diluídos 1:100 e incubados com 20 µL de fagos imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de cabra anti-bovino HRP (Sigma).

GRÁFICO 8: REATIVIDADE DOS CLONES ELUÍDOS POR COMPETIÇÃO FRENTE AO *POOL* DE SOROS BOVINOS POSITIVO E NEGATIVO.



Os *pools* de soros de bovinos foram diluídos 1:100 e incubados com 20 μ L de fagos imobilizadas na placa. A ligação foi detectada adicionando-se anticorpo de cabra anti-bovino HRP (Sigma).

4.8 SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS

Dos 49 fagos selecionados, 38 tiveram seus DNAs seqüenciados. Destes, 14 eram provenientes da eluição por acidez e 24 dos eluídos por competição. A seqüência de 15 aminoácidos (aa) do clone A4(C) repetiu-se por 15 vezes, a do E4(C), repetiu-se 3 vezes e as demais, apenas 1 vez. O tamanho dos peptídeos, a freqüência com que eles apareceram, os aa predominantes são citados nas TABELAS 8 e 9.

TABELA 8 – FAGOS ELUIDOS POR ACIDEZ, TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS PEPTIDICAS, FREQUÊNCIA COM QUE ELAS APARECERAM E AMINOÁCIDOS PREDOMINANTES.

	Peptídeo* (Clone)	Tamanho	Freq.	Aa predominantes
FAGOS ELUIDOS POR ACIDEZ	BC-1 (D12)	17 aa	1(14)	Prolina (4/17) e Glicina (3/17)
	BC-2 (B10)	17 aa	1(14)	Arginina (4/17) e Leucina (2/17)
	BC-3 (B12)	17 aa	1(14)	Valina (4/17) e Serina (2/17)
	BC-4 (C10)	17 aa	1(14)	Valina (2/17) e Lisina (2/17)
	BC-5 (F5)	17 aa	1(14)	Isoleucina (2/17) e Prolina (2/17)
	BC-6 (G8)	17 aa	1(14)	Leucina (3/17) e Serina (2/17)
	BC-7 (G4)	17 aa	1(14)	Treonina (3/17) e Prolina (3/17)
	BC-8 (D9)	17 aa	1(14)	Treonina (3/17) e Glutamina (3/17)
	BC-9 (H7)	15 aa	1(14)	Treonina (2/15) e Tirosina (2/15)
	BC-10 (E4)	12 aa	1(14)	Treonina (3/12) e Serina (2/12)
	BC-11 (B6)	12 aa	1(14)	Valina (2/12) e Aspartato (2/12)
	BC-12 (E5)	12 aa	1(14)	Valina (4/12)
	BC-13 (H10)	8 aa	1(14)	Prolina (2/8)
	BC-14 (H11)	8 aa	1(14)	Serina (2/8)

*BC = *Bovine Cysticercosis*

TABELA 9 – FAGOS ELUIDOS POR COMPETIÇÃO, TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS PEPTIDICAS, FREQUÊNCIA COM QUE ELAS APARECERAM E AMINOÁCIDOS PREDOMINANTES.

FAGOS ELUIDOS POR COMPETIÇÃO	Peptídeo* (Clone)	Tamanho	Freq.	Aa predominantes
	BC-15 (H4)	17aa	1(24)	Arginina (4/17)
	BC-16 (G4)	17 aa	1(24)	Arginina (3/17)
	BC-17 (A4, A5, B4, G2, B1, G3, E2, D6, B3, F6, F4, A3, H6, H5, G6)	15 aa	15(24)	Fenilalanina (2/15)
	BC-18 (E4, E1, H3)	15 aa	3(24)	Treonina (2/15)
	BC-19 (D4)	15 aa	1(24)	Alanina (2/15)
	BC-20 (C1)	15aa	1(24)	Alanina (4/15)
	BC-21 (C4)	12 aa	1(24)	Triptofano (3/12)
	BC-22 (F2)	12 aa	1(24)	Cisteína (3/12)

* BC = *Bovine Cysticercosis*

Os peptídeos apresentaram identidade com proteínas de funções diversas depositadas no banco de dados de proteínas (BLAST). Na TABELA 10 são apresentadas as principais proteínas relacionadas aos clones sequenciados. Os peptídeos BC-9, BC-1, BC-13 e BC-14 dos clones eluídos por acidez não apresentaram identidade com nenhuma proteína conhecida de *T. saginata*; enquanto os peptídeos BC-17, BC-22 e BC-15 dos clones eluídos por competição, tiveram identidade com antígenos já utilizados no diagnóstico da cisticercose bovina.

TABELA 10 – IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS COM PROTEÍNAS DO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS (BLAST).

(Continua)

Peptídeo	Potenciais Antígenos	Acesso Banco
BC-17	1) NADH desidrogenase subunidade IV [<i>Taenia saginata</i>]	1) gb ADH29589.1
	2) c-jun [<i>Taenia solium</i>]	2) gb AAS88553.1
	3) Citocromo C oxidase subunidade III [<i>Taenia saginata</i>]	3) ref YP_001527634.1
	4) Antígeno 45W [<i>Taenia ovis</i>]	4) pir IS03906
BC-18	1) DNA polimerase delta [<i>Taenia saginata</i>]	1) emb CBH41134.1
	2) RNA polimerase II [<i>Taenia saginata</i>]	
	3) NADH desidrogenase subunidade V [<i>Taenia saginata</i>]	2) emb CBH32900.1 3) ref YP_0015276435.1
BC-21	1) Citocromo C oxidase subunidade I [<i>Taenia saginata</i>]	1) dbj BAJ07329.1
	2) Proteína ribossomal L37a [<i>Taenia crassiceps</i>]	2) gb AAL83670.1
	3) Proteína semelhante a tripsina [<i>Taenia solium</i>]	3) gb ADP89566.1
BC-15	1) Antígeno de oncosfera 18kDa [<i>Taenia saginata</i>]	1) gb ADO86979.1
BC-16	1) NADH desidrogenase subunidade 2 [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527639.1
BC-19	1) Proteína ribossomal S15a [<i>Taenia saginata</i>]	1) gb AAP35027.1
BC-22	1) NADH desidrogenase subunidade III [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527641.1
	2) Antígeno de Oncosfera 18kDa [<i>Taenia saginata</i>]	2) gb ADO86979.1
	3) NADH desidrogenase subunidade V [<i>Taenia saginata</i>]	3) ref YP_001527645.1
BC-20	1) Proteína hipotética [<i>Taenia saginata</i>]	1) emb CAD23242.1

(Continua)

	2) RNA polimerase II [<i>Taenia saginata</i>]	2) emb CBH32900.1
BC-1	1) Fator transcricional c-jun [<i>Taenia crassiceps</i>]	1) gb AAN77236.1
	2) Antígeno de diagnóstico TSES33 [<i>Taenia solium</i>]	2) emb CAX86983.1
	3) Transportador de glucose TGTP2 [<i>Taenia solium</i>]	3) gb AAB05920.1
BC-11	1) Citocromo B [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527635.1
	2) ATPase subunidade VI [<i>Taenia saginata</i>]	2) dbj BAC98839.1
BC-14	1) Proteína kinase [<i>Taenia asiatica</i>]	1) emb ABN14977.1
BC-13	1) Ubiquitina ligase [<i>Taenia solium</i>]	1) emb CAD21557.1
BC-6	1) Citocromo C oxidase subunidade I [<i>Taenia saginata</i>]	1) dbj BAJ07329.1
BC-9	1) Proteína de oncosfera Tso22b [<i>Taenia solium</i>]	1) gb AAW88552.1
	2) Proteína semelhante a calponina [<i>Taenia asiatica</i>]	2) gb ABN14959.1
BC-2	1) Paramiosina [<i>Taenia saginata</i>]	1) sp Q8T305.1 MYSP_TAESA
	2) Proteína semelhante a miosina [<i>Taenia saginata</i>]	2) emb CAA65728.1
BC-3	1) Citocromo C oxidase subunidade I [<i>Taenia saginata</i>]	1) dbj BAI43666.1
BC-4	1) NADH desidrogenase subunidade 6 [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527644.1
BC-12	1) NADH desidrogenase subunidade V [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527645.1
	2) Cisteína peptidase semelhante a catepsina L [<i>Taenia saginata</i>]	2) dbj BAH03396.1
	3) Citocromo B [<i>Taenia saginata</i>]	3) ref YP_001527635.1
	4) ATPase subunidade VI [<i>Taenia saginata</i>]	4) dbj BAC98841.1
	5) Citocromo C oxidase [<i>Taenia saginata</i>]	5) dbj BAJ07329.1

BC-5	1) Citocromo B [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527635.1
	2) DNA polimerase delta [<i>Taenia saginata</i>]	2) emb CBH41134.1
	3) ATPase subunidade VI [<i>Taenia saginata</i>]	3) dbj BAC98841.1
BC-10	1) Proteína ribossomal S15a [<i>Taenia saginata</i>]	1) dbj BAC98841.1
	2) NADH desidrogenase subunidade V [<i>Taenia saginata</i>]	2) ref YP_001527645.1
BC-7	1) NADH desidrogenase subunidade IV [<i>Taenia saginata</i>]	1) ref YP_001527637.1
BC-8	1) Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [<i>Taenia saginata</i>]	1) emb CBH36497.1

4.9 IMUNOENSAIOS COM OS PEPTÍDEOS LIGADOS À MEMBRANA

Após a obtenção dos primeiros peptídeos BC-17, BC-21, BC-15, BC-16, BC-1, BC-11, BC-14, BC-4, BC-10, BC-13, BC-12, BC-7 e BC-5, os mesmos foram sintetizados sobre uma membrana de celulose e submetidos à técnica de Spot com a utilização dos *pools* de soros de bovinos positivo e negativo.

As sequências aminoacídicas dos clones foram reativos com anticorpos presentes nas amostras de soros positivos. Os peptídeos BC-1, BC-14, BC-10, BC-13, BC-12 e BC-7 não apresentam reatividade na diluição padrozinada anteriormente no WB (1:2000) (FIGURA 11).

A sequência BC-10 que teve identidade com os aa TW- - -FP de um antígeno já utilizado no diagnóstico da cisticercose bovina, ao ter seu aa original substituído (seta 1), perdeu reatividade. O mesmo ocorreu após a substituição de seu último aa.

O peptídeo BC-15 que teve identidade com outro antígeno usado no diagnóstico da cisticercose nos aa AI-PR, perdeu sua reatividade quando dois aa foram substituídas (setas 3 e 4).

O peptídeo BC-16 que teve identidade com a proteína NADH desidrogenase de *T. saginata*, ao terem seus dois últimos aa substituídos, também perderam reatividade (setas 5 e 6).

A sequência BC-11 que teve identidade com proteína do citocromo B nos aa DV-YF e com a subunidade VI da ATPase de *T. saginata*, nos aa DVVY-, perdeu sua reatividade quando suas valinas (seta 7 e 8) e fenilalanina (seta 9) foram substituídas.

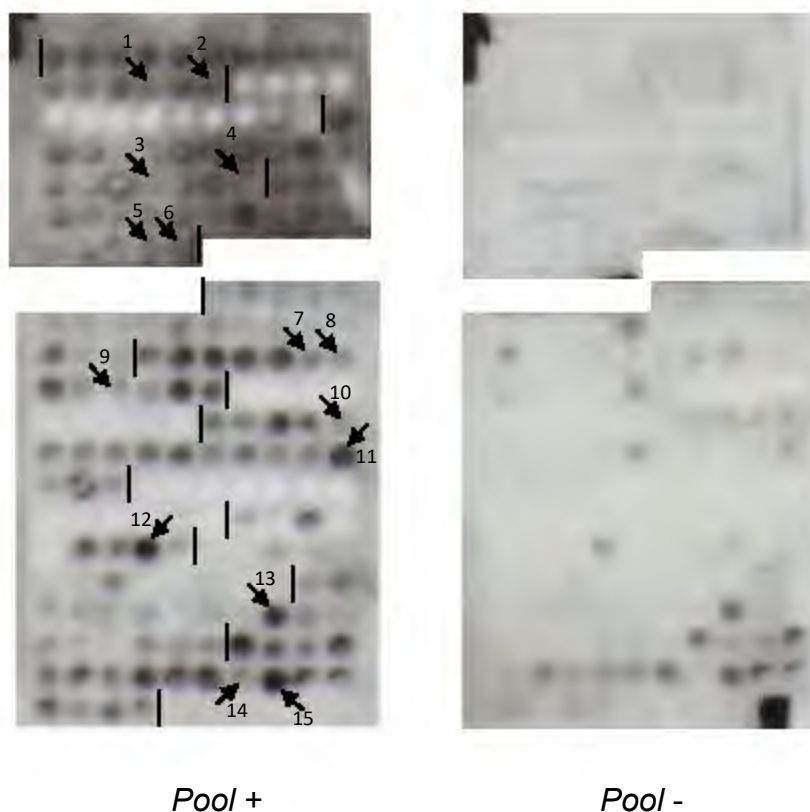
O peptídeo BC-4 que teve identidade com uma proteína da subunidade VI do NADH desidrogenase, perdeu sua reatividade ao ter seu aa original substituído (seta 10). Porém, a seta 11 mostra que quando sua lisina foi substituída pela alanina, o peptídeo mostrou-se muito mais reativo ao soro bovino.

O peptídeo BC-13 não teve identidade com nenhuma proteína de *T. saginata* depositada no *BLAST*, mas pode-se observar na seta 12 que a substituição da cisteína pela alanina, fez o peptídeo ser mais reativo aos anticorpos anti-*C. bovis* presentes nos soros bovinos.

O peptídeo BC-7 teve identidade com os aa LL- - -FW da subunidade IV da NADH desidrogenase, mas não se pode afirmar que perdeu reatividade com alguma substituição, devido a falta de clareza do resultado, mas pode-se observar que a troca da cisteína (seta 13), fez aumentar a reatividade.

O peptídeo BC-5 que teve identidade com os aa IRVLS do citocromo B da *T. saginata*, perdeu reatividade quando um aminoácido foi substituído (seta 14), mas com a substituição da arginina pela alanina, o peptídeo ficou mais reativo aos anticorpos presentes no *pool* de soros bovinos (seta 15).

FIGURA 11 – Reatividade das amostras de soro de bovinos frente aos peptídeos em membrana de celulose. Para os clones eluídos por competição (membrana menor), os soros foram usados na diluição 1:4000, e para os clones eluídos por acidez (membrana maior), 1:2000. O tempo de exposição ao filme fotográfico foi de 1 minuto. As setas indicam os aminoácidos essenciais para o reconhecimento dos anticorpos presentes no *pool* de soros de alto título para cisticercose bovina.



5. DISCUSSÃO

No Brasil, apesar do complexo teniose/cisticercose ser um grande problema de saúde pública e ameaçar exportações (BRASIL, 1952), o diagnóstico da cisticercose bovina permanece como um desafio (FERRER et al., 2003; MINOZZO et al., 2004; OGUNREMI et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; 2007; GIROTTO et al., 2008; OGUNREMI; BENJAMIN, 2010). Hoje, a única exigência feita pela inspeção de carnes é a rotina de exame de masseteres, coração e diafragma. Este procedimento segundo Cabaret e colaboradores (2002) detecta apenas 40% dos animais positivos e a inspeção de coração revela apenas 10%. É evidente que não se pode esperar a erradicação da cisticercose apenas com a inspeção de carnes especialmente do modo como ela é praticada.

Como tentativa de controle do complexo, muitos estudos têm se focado na avaliação de bons antígenos que possam ser utilizados em testes sorológicos, e resultados muito promissores foram obtidos com antígenos brutos de parasitos, tanto homólogos, derivados da *T. saginata* (OGUNREMI; BENJAMIN, 2010), quanto heterólogos, derivados de *T. crassiceps* (MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; GIROTTO et al., 2008; THOMAZ-SOCCOL et al., 2010) e *T. solium* (MONTEIRO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010). Contudo, antígenos brutos têm limitações, como a variação de lotes que pode gerar resultados diferentes entre os laboratórios, custos com manutenção dos mamíferos hospedeiros, o tempo de desenvolvimento do parasito e a obtenção do extrato para uso, fatores que inviabilizam sua produção para uso em imunodiagnósticos.

Com base nisso, o uso de peptídeos sintéticos miméticos a epitopos de anticorpos específicos torna-se interessante, porque além de não ter nenhuma das desvantagens acima citadas, eles podem ser extremamente sensíveis e específicos na detecção de doenças infecciosas, parasitárias, crônicas etc.

O elevado grau de adaptação do *C. bovis* ao bovino muitas vezes resulta em pobre produção de anticorpos, o que pode dificultar a interpretação dos achados em testes sorológicos (GEERTS, 1981; SMITH et al., 1991). Por isso, para a detecção da

doença *ante-mortem*, seria necessária uma técnica sensível que permitisse o diagnóstico preciso da infecção.

Estudos utilizando bibliotecas de peptídeos apresentados em bacteriófagos têm se tornado metodologia importante para o encontro de ligantes de anticorpos. A tecnologia do *Phage Display* utiliza fagos como ferramentas para analisar e amplificar a proteína de interesse com eficiência (ARAP, 2005).

Neste sentido, no presente trabalho, a técnica do *Phage Display* foi escolhida por conseguir identificar sequências aminoacídicas miméticas aos epitopos de anticorpos bovinos contra *C. bovis*, que após serem sintetizadas quimicamente, poderão ser utilizadas em protocolos de diagnóstico para detectar a enfermidade no animal ainda vivo, num ensaio *ante-mortem* para a cisticercose bovina.

Para avaliar o perfil protéico e a antigenicidade de *C. bovis* frente aos anticorpos bovinos, os antígenos de excreção e secreção, escólex e cisto calcificado foram testados. O perfil protéico de *C. bovis* revelou um padrão de bandas diferente nos três antígenos avaliados. Verifica-se que várias bandas são comuns aos extratos, principalmente entre as massas de 30 a 70 kDa, embora, aparentemente, sejam expressas em maior ou menor quantidade, dependendo do estágio do cisticerco. Contudo, não se pode afirmar que sejam as mesmas proteínas. Para tanto, estudos proteômicos dos antígenos seriam necessários para esclarecer essa questão, como o realizado pela equipe de Lee (2005) e de Santivañez (2010), que utilizaram a cromatografia líquida e espectrofotometria de massas na tentativa de identificar proteínas que pudessem ser utilizadas no diagnóstico de Neurocisticercose bem como elucidar a relação parasito-hospedeiro definitivo durante a fase de infecção de *T. solium*.

No extrato antigênico produzido com escólex de *C. bovis* foi possível verificar 28 bandas protéicas nítidas. Resultados semelhantes foram obtidos para *T. solium* por Monteiro (2004) e Neto e colaboradores (2007) os quais analisaram o perfil eletroforético de proteínas do escólex e encontraram 30 e 21 bandas, respectivamente.

Aparentemente, nossos resultados indicam que as proteínas do escólex de *C. bovis* não apresentam uma antigenicidade significativa quando em contato com anticorpos bovinos. Fato que pode estar relacionado com a condição do parasito em seu hospedeiro intermediário, ou seja, do metacestódeo se encontrar naturalmente envolto por uma

cápsula protéica que assegura proteção e barreira contra grandes trocas com o meio. Porém, quando este antígeno foi avaliado com soro policlonal de coelho (imunizado com extrato bruto de *C. bovis*), o perfil protéico de reconhecimento foi completamente diferente, sugerindo que os antígenos do escólex são além de antigênicos, imunogênicos. O que nos faz levantar a hipótese que antígenos de escólex poderiam eventualmente ser usados para imunização contra *T. saginata*.

Como uma primeira tentativa, a escolha do antígeno preparado a partir de escólex, se deu pela abundância de material. Devido ao foco dos experimentos, a equipe de Hell (2009) também empregou como antígeno o escólex, mas dessa vez de *C. cellulosae*, enquanto que Ogunremi e Benjamin (2010) utilizaram proteínas de excreção/secreção de *C. bovis*, e o grupo de Ribeiro (2010) utilizou o extrato total de *C. cellulosae*, que após serem dissecados, foram triturados, sonicados, centrifugados e do sobrenadante constituiu-se o antígeno usado, chamado de extrato S. Todos os autores apresentaram resultados muito promissores.

Como estratégia para o *Phage Display* dois tipos de eluição foram realizadas: por acidez e por competição. A primeira, que desfaz inespecificamente toda e qualquer ligação dos fagos com os anticorpos imobilizados, mostrou fagos mais reativos nos testes ELISA. Possivelmente devido a inespecificidade da eluição e, portanto, grande diversidade de sequências peptídicas existentes, porém esses peptídeos apresentados pelos fagos foram menos específicos na técnica de spot. Seis, dos nove peptídeos sintetizados na membrana de celulose, oriundos do *pool* de fagos eluídos por acidez, não reagiram com anticorpos presentes nos soros de bovinos com cisticercose na diluição padronizada, esse fenômeno sugere que a conformação adquirida pelo peptídeo na superfície do fago possa ser importante para o reconhecimento pelo anticorpo.

Para testar a antigenicidade dos fagos selecionado frente aos *pools* de soros bovinos, as absorbâncias do pool de fagos das eluições por acidez e por competição foram 2,7 e 3 vezes maior que o *pool* de soros negativos, respectivamente, o que sugere que os fagos reconhecem e diferenciam soros de animais com cisticercose.

Na eluição por competição, o aumento da reatividade com as IgGs seguiu de maneira gradativa, fato corroborado por Fumagalli (2008) e pelo grupo de Hell (2009). Por outro lado, a reatividade dos fagos eluídos por acidez, diminuiu drasticamente depois

do primeiro *panning*, sugerindo que os fagos eluídos e amplificados não eram tão específicos ou não apresentavam avidéz o suficiente para que fossem selecionados por anticorpos em menores concentrações. A quantidade de fagos obtidos após a eluição foi sempre menor que a quantidade de fagos incubados, sugerindo que imunosseleção de fagos utilizando-se anticopos anti-*C. bovis* foi eficiente.

Partindo para o isolamento e caracterização por sequenciamento de clones de cada um dos *pools*, observou-se que os clones selecionados por competição A4 se repetiu em 62,5% (15/24) das sequências e o E4 em 12,5% (3/24). A equipe de Ribeiro (2010) também encontrou repetição em uma sequência identificada por sua equipe: o clone NC₄₁ apareceu em 88,9% (72/81) dos seus achados.

Com relação aos fagos eluídos por acidez não foi observado o mesmo fenômeno, ou seja, a modificação de pH faz com que haja a dissociação inespecífica da interação antígeno e anticorpo, enquanto na eluição por competição, os fagos eluídos são aqueles cujas características são muito semelhantes ao antígeno original. Nesse último caso, a probabilidade da ocorrência de eluição de fagos com mesma sequência peptídica é maior, independentemente do número de seleções.

Após o sequenciamento, observou-se que os aminoácidos apolares Prolina, Valina, Treonina, Glicina foram aqueles que apresentaram maior freqüência dentre as sequências obtidas. A alta freqüência de aminoácidos pode estar associada a um possível epítipo no qual os anticorpos se ligam com maior especificidade.

Quando os peptídeos selecionados pela nossa equipe tiveram suas sequências aminoacídicas comparadas àquelas presentes em bancos de dados de proteínas (BLAST), observou-se que vários apresentavam identidade com proteínas de *T. saginata* já conhecidas. Entretanto, os clones H7, D12, H10 e H11 eluídos por acidez não tinham identidade com nenhuma delas, possivelmente pelo fato dessas sequências serem mimotopos de anticorpos bovinos ou por não haver proteínas homólogas já descritas.

Curiosamente os peptídeos BC-17, BC-15 e BC-22 selecionados pela eluição por competição tiveram identidade com duas proteínas (peptídeos de *T. saginata* homólogo ao antígeno 45W da *Taenia ovis* e antígenos de adesão de 18kDa, secretados pela oncosfera de *T. saginata*) já usadas pelo grupo de Ferrer (2003) no diagnóstico da cisticercose bovina.

Após a obtenção das sequências, alguns peptídeos foram sintetizados quimicamente sobre uma membrana, e apesar de todos os clones terem sido testados por ELISA e serem selecionados pela alta reatividade frente as IgGs sensibilizadas na placa, após sua síntese, verificou-se que os peptídeos BC-1, BC-14, BC-10, BC-13, BC-12 e BC-7 eluídos por acidez, não mais apresentaram reação com as amostras de soro. Fato este é corroborado por Fumagalli (2008), que teve o mesmo problema em relação ao clone denominado de 3B. O autor levanta a hipótese que ao ser sintetizado, o peptídeo mudou sua conformação, perdendo assim, a capacidade de reconhecimento pelos anticorpos presente nos soros ou, como citado anteriormente, a presença de proteínas do capsídeo do fago sejam importantes na interação antígeno-anticorpo. Esta hipótese precisaria ser testada utilizando-se de outras tecnologias como por exemplo a cristalografia ou dicroísmo circular.

O uso da técnica do ALA *scan* realizada durante o procedimento de síntese dos peptídeos sobre a membrana, mostrou-se eficiente, porque foi possível detectar reatividades distintas entre os spots após substituição pela alanina. Esta estratégia de síntese é pioneira e se mostra promissora.

Com os incansáveis programas de controle por antiparasitários específicos e erradicação das enfermidades parasitárias, antígenos nativos estão cada vez mais difíceis de serem obtidos. Assim, o *Phage Display* se mostra como uma alternativa na obtenção de antígenos purificados, homogêneos e que possam ser produzidos em escala industrial, colocando o Brasil na vanguarda tecnológica.

Com o diagnóstico preciso da infecção, os produtores poderão detectar e tratar os animais com cisticercose antes de irem para o abate, evitando a entrada dos infectados no abatedouro o que, além de evitar o estresse no bovino, implicaria economia relativa ao transporte da res, ao corte e ao processamento. Além disso, o desenvolvimento de um método diagnóstico confiável poderia ser útil em investigações epidemiológicas da cisticercose bovina.

6. CONCLUSÃO

A técnica do *Phage Display* mostrou-se eficiente para a seleção de peptídeos reativos com anticorpos de bovinos com cisticercose. As sequências aminoacídicas dos clones obtidos estão em fase de patenteamento.

Os fagos da eluição por acidez e por competição diferenciam soros positivos e negativos para cisticercose.

Os peptídeos BC-18, BC-22 e BC-15 obtidos pela eluição por competição tiveram identidade com antígenos já usados no diagnóstico da cisticercose bovina, enquanto que BC-17, BC-21, BC-16, BC-19, BC-20, BC-6, BC-1, BC-2, BC-11, BC-3, BC-4, BC-12, BC-5, BC-10, BC-7 e BC-8 tiveram identidade com proteínas conhecidas de *T. saginata* depositadas no banco de dados de proteínas, sugerindo que estes epitopos/mimotopos são promissores no sentido da sua utilização em kits diagnósticos para detecção *ante-mortem* da cisticercose, bem como em vacinação experimental.

7. PERSPECTIVAS

- Seqüenciar os clones A8, B5, C1, C2, C3, C8, C12, F11, D8, G5 e G10 eluídos por acidez e avaliar suas identidades com outras proteínas depositadas em banco de dados.
- Sintetizar em membrana de celulose o restante das sequências peptídicas obtidas.
- Testar por ELISA a imunorreatividade de cada clone individualmente, utilizando-se de soros bovinos positivos para cisticercose e com soros bovinos negativos para cisticercose, para avaliar a sensibilidade do ensaio e ainda com soros de bovinos com outras parasitoses, para avaliação da especificidade do antígeno.
- Avaliar a antigenicidade de cada clone, com a realização de ELISA de competição, sensibilizando-se a placa com antígeno bruto de *C. bovis*, e incubando, ao mesmo tempo, soro de bovino com cisticercose e fagos.
- Sintetizar quimicamente as sequências de peptídeos mais sensíveis e específicas para detecção da cisticercose bovina e avaliar a proteção de camundongos contra infecção experimental por metacestódeos de *T. crassiceps*.
- Avaliar a proteção de cada peptídeo, individualmente ou constituindo-se de um *pool*, contra infecção experimental em bovinos.
- Produção de anticorpos poli (e monoclonais) contra cada um dos peptídeos para análise de sua imunolocalização em cistos viáveis e calcificados de *C. bovis*.
- Os antígenos ainda poderão ser testados para avaliar sua potencialidade na detecção de pacientes com neurocisticercose.

CAPÍTULO 2

MIMOTOPO DE *Taenia solium* SELECIONADO POR *PHAGE DISPLAY* PROTEGE CAMUNDONGOS CONTRA A INFECÇÃO POR METACESTODEOS DE *Taenia crassiceps*.

RESUMO

A neurocisticercose (NCC) é resultado da presença de metacestódeos de *Taenia solium* no sistema nervoso central humano. A fim de propor novas alternativas para o imunodiagnóstico da NCC, Hell e colaboradores (2009) utilizaram a tecnologia de *Phage Display* para selecionar uma sequência aminoacídica empregando anticorpos de pacientes com NCC. Esse peptídeo, denominado de NC-1, após síntese química foi capaz de identificar pacientes portadores da parasitose em ELISA de captura. Considerando-se as características imunoquímicas desse peptídeo, o objetivo do presente estudo foi avaliar se essa sequência peptídica seria capaz de proteger camundongos contra infecção experimental por metacestodeos de *Taenia crassiceps*. Foram utilizados 24 camundongos (fêmeas, SWISS) divididos em 3 grupos de 8 animais de modo que 3 antígenos pudessem ser testados: antígeno bruto de metacestodeos de *T. crassiceps* (TcCa), utilizado como controle positivo, peptídeo sintético NC-1 acoplado à albumina bovina e somente o BSA, utilizado como controle negativo. Uma semana após a oitava imunização, o título de anticorpos dos camundongos foi avaliado por ELISA e após uma dose de reforço, os animais foram desafiados com inoculação intraperitoneal de 5 cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval. Quatro semanas depois do desafio, os animais foram eutanasiados e submetidos à lavagem peritoneal com PBS para retirada dos parasitos que foram separados por tamanho (≤ 1 mm, $1 < x < 5$ mm e ≥ 5 mm) e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento (inicial, larval ou final). Análises estatísticas indicaram que animais imunizados com NC-1 apresentaram resposta muito semelhante àqueles imunizados com TcCa com substancial redução da parasitemia, ou seja, em 74% e 77%, respectivamente. A imunização com NC-1 influenciou também o tamanho e o estágio de desenvolvimento dos parasitos. Utilizando-se anticorpos murinos anti NC-1 sobre o cisticerco em estágio larval foi possível verificar reatividade sobre o tegumento, rico em mitocôndrias, enquanto que uma intensa imunomarcagem foi observada na fase final do metacestódeo. Uma das hipóteses é que anticorpos anti NC-1 reconhecem enzimas da cadeia respiratória como citocromo oxidase e NADH devido à identidade entre as sequências aminoacídicas. Os resultados apresentados por nosso grupo indicam que NC-1, um mimotopo de 15 aminoácidos, revelou-se um importante candidato para o desenvolvimento de vacinas contra cisticercose.

Palavras-Chave: NC-1. *Phage Display*. Cisticercose murina. *Taenia crassiceps*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O ciclo natural do metacestodeo da *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*), tem os suínos como hospedeiros intermediários e o ser humano como único hospedeiro definitivo do verme adulto. Acidentalmente, o homem pode ingerir ovos viáveis oriundos de material fecal humano contaminado e desenvolver a cisticercose humana. Os ovos eclodem no estômago e os embriões hexacanto perfuram a mucosa intestinal, disseminando-se através da circulação sanguínea, para a musculatura e/ou sistema nervoso central (GARCIA et al., 2003), desencadeando a cisticercose muscular ou cerebral, também conhecida como neurocisticercose (NCC).

Devido ao pleomorfismo dos sintomas humanos, o diagnóstico da NCC geralmente é baseado em uma combinação de sinais clínicos, análise de imagens, dados epidemiológicos e imunológicos (DEL BRUTTO et al. 2001; HAWK et al., 2005). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética são as ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e específicas, porém, seu alto custo e disponibilidade restrita, tornam seus usos limitados principalmente em países em desenvolvimento e com altas taxas de infecção (RIBEIRO, 2009).

O desenvolvimento de teste imunológico baseado na detecção de anticorpos específicos no soro e/ou líquido cefalorraquediano (LCR), resultam em ensaios confiáveis para o diagnóstico da NCC (RIBEIRO, 2009). Mas, segundo Kong e colaboradores (1992), a maioria dos testes que utilizam antígenos totais perdem sensibilidade e especificidade e reações cruzadas com outras parasitoses ocorrem com frequência (RIBEIRO, 2010).

Assim, a fim de propor novas alternativas para o imunodiagnóstico da parasitose, Hell e colaboradores (2009) utilizaram a tecnologia do *Phage Display* para selecionar uma sequência aminoacídica capaz de ser utilizada como antígeno em testes ELISA e que fosse capaz de identificar pacientes portadores de NCC.

Considerando estudos anteriores envolvendo a capacidade de proteção de peptídeos selecionados por *Phage Display* contra toxinas (HERNANDEZ et al., 2002), bactérias (WANG et al. 2007), vírus (CHEN et al. 2001), fungos (DATTA et al. 2008) e parasitas (WU et al. 2006), este trabalho buscou avaliar a capacidade de proteção

induzida pelo peptídeo sintético NC-1, em camundongos contra infecção experimental por metacestódeos de *Taenia crassiceps*.

A cisticercose murina foi escolhida como modelo experimental devido à facilidade de manutenção dos cisticercos em camundongos, pela visualização e rápida contagem da carga parasitária, pelos aspectos de biossegurança e também porque cisticercos de *T. crassiceps* (*Cysticercus longicollis*) são usualmente empregados em estudos imunológicos e bioquímicos sobre a cisticercose (VINAUD et al. 2008; CASTELLANOS-SANCHES et al. 2009; PERALTA et al. 2010) ou como fonte de antígeno bruto heterólogo para imunoensaios da NCC (VAZ et al. 1997; PARDINI et al. 2002; BARCELOS et al. 2005; MINOZZO et al. 2008), devido às semelhanças antigênicas com *T. solium* (TOLEDO et al. 1999; MINOZZO et al. 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

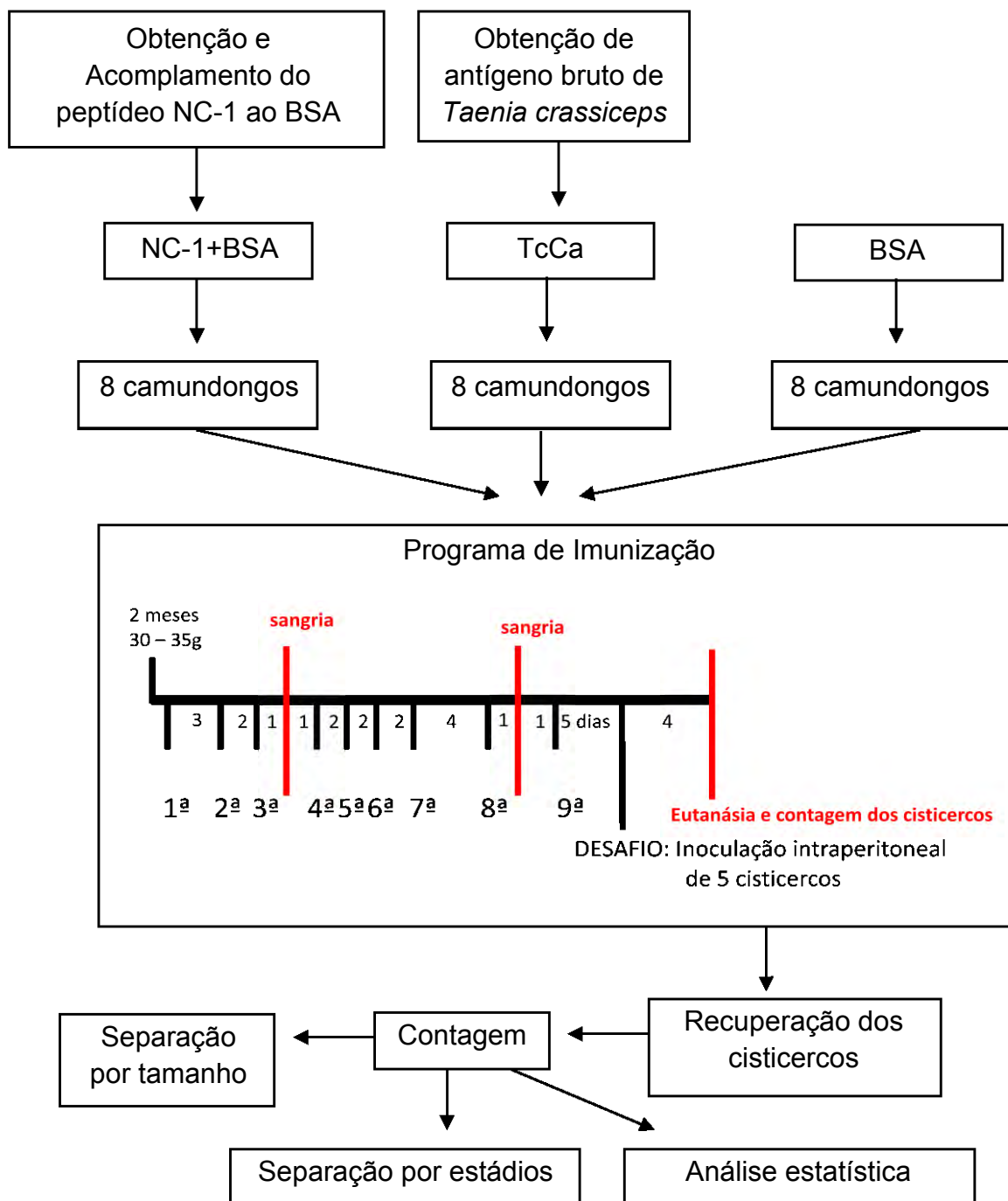
Avaliar se o peptídeo NC-1 reconhecido por anticorpos produzidos contra NCC é capaz de proteger camundongos contra infecção experimental por metacestodeos de *Taenia crassiceps*.

2.2 Específicos

1. Acoplar o peptídeo sintético NC-1 ao BSA;
2. Imunizar camundongos com NC-1 acoplado ao BSA, com antígeno bruto de *T. crassiceps* e somente com BSA (grupo controle);
3. Sangrar os animais e avaliar a reatividade dos anticorpos produzidos contra os imunógenos;
4. Inocular cisticercos no peritoneo dos camundongos;
5. Sacrificar os camundongos, recuperar os cisticercos, contá-los e separá-los por tamanho e por estádios de desenvolvimento.

3. METODOLOGIA

A fim de alcançar os objetivos propostos, o fluxograma abaixo apresentado resume os diferentes instrumentos e etapas realizadas neste estudo.



3.1 ANIMAIS

Camundongos fêmeas da linhagem SWISS, de sete a nove semanas de idade foram mantidos no Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI) localizado em Piraquara/Pr, em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal local. Os animais foram divididos em três grupos contendo oito camundongos cada um, e tiveram acesso *ad libitum* à ração e água.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS

O peptídeo sintético NC-1 obtido pela técnica do *Phage Display* por Hell e colaboradores (2009) foi cedido por nosso colaborador Prof. Dr. Carlos Delfin Chaves Orlotegui da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O peptídeo sintético foi acoplado à BSA no resíduo de cisteína localizado na porção C-terminal da proteína. Resumidamente, 1mg de BSA foi incubado com 1mg de sulfosuccinimidil 4 - (N maleimidomethyl) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC, Pierce Chemical Rockford, IL) diluído em DMSO. Depois de 1 hora, sob agitação, no escuro e em temperatura ambiente, a mistura foi eluída por uma coluna de resina PD-10 descartável, de modo a separar o BSA ativado (ligado ao SMCC) do não ativado. As alíquotas de BSA ativado foram incubadas com 500µg do peptídeo por 2 horas, sob agitação, no escuro e em temperatura ambiente. Depois de parar a reação de conjugação, as cisteínas livres foram bloqueadas ao se adicionar uma solução de Cisteína a 1mM. O peptídeo acoplado ao BSA foi alíquotado e armazenado a -20° C.

O antígeno bruto de larvas de *T. crassiceps* foi cedido por nosso colaborador Dr. João Carlos Minozzo do CPPI. Para produção deste antígeno foi utilizada a cepa ORF de *C. longicollis*. O antígeno constitui-se de fluído vesicular e proteínas solúveis de membrana, as quais são mantidas pela passagem consecutiva de cisticercos na cavidade peritoneal de camundongos e processadas como descrito por Minozzo e colaboradores (2004).

3.3 PROGRAMA DE IMUNIZAÇÃO E DESAFIO

Foram utilizados 24 camundongos (fêmeas, SWISS/CPPI) divididos em 3 grupos de 8 animais. Os grupos foram divididos de modo que os 3 antígenos pudessem ser testados. São eles: antígeno bruto de metacestodeos de *T. crassiceps* (TcCa) utilizado como controle positivo, peptídeo sintético NC-1 acoplado à albumina bovina e somente o BSA, utilizado como controle negativo. Os animais foram imunizados com 20 µg de antígeno diluídos em 100 µL. Cada camundongo recebeu a primeira dose subcutânea com o imunógeno emulsionado em adjuvante completo de Freund e as outras 8 doses foram intraperitoneais com o imunógeno homogeneizado em adjuvante incompleto de Freund. Uma semana após a terceira e oitava dose, aproximadamente 20 µL de sangue foi coletado pela via periorbital utilizando-se colírio anestésico. Dessa forma, o título de anticorpos pode ser avaliado por ELISA.

3.4 ELISA PARA TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS

Placas Falcon de 96 wells foram sensibilizadas com 10 mg/mL dos três diferentes antígenos (NC-1 não acoplado ao BSA, TcCa e BSA) diluídos em tampão carbonato pH 8,6, por 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas com solução de lavagem (0,05% Tween 20) e bloqueadas com caseína 2% em PBS-T 0,05%. Depois de titulado previamente, para definir qual a melhor diluição, o primeiro anticorpo obtido do soro dos animais imunizados foi diluído 1:50 em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% Tween 20) foi adicionado nos poços e incubados a 37°C por 1 hora. O segundo anticorpo adicionado foi imunoglobulina anti-mouse conjugada à enzima peroxidase (SIGMA), diluída 1:4000 em tampão de incubação. A atividade enzimática foi revelada utilizando-se do ortofenilenodiamino (OPD) e H₂O₂. Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico 2N. A leitura das absorbâncias (A_{492nm}) foi realizada em leitor de ELISA Bio-Rad.

3.5 DESAFIO, EUTANASIA E CONTAGEM DOS CISTOS

Constatado o título de anticorpos, uma semana após a segunda sangria, os camundongos receberam uma dose reforço nas mesmas condições já descritas. Uma semana depois, os animais foram desafiados com uma inoculação intraperitoneal de cinco cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval (entre 2 e 3 mm cada um) ressuspensos em 100µL de PBS esterilizado. Quatro semanas depois do desafio, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e submetidos à lavagem peritoneal com solução salina fosfatada tamponada (PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2) para retirada dos cisticercos que foram lavados com PBS, contados, separados por tamanho (≤ 1 mm, $1 < x < 5$ mm e ≥ 5 mm) e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento (inicial – membrana transparente e ausência de brotos; larval – membrana transparente e presença de brotos, fase de reprodução; ou final – membrana opaca e ausência de brotos).

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cisticercos de 2-3 mm em fase larval (fase de reprodução do cisticerco; vesícula é transparente e há presença de brotos) e em fase final (vesícula é opaca e não há presença de brotos) (OSTOA-SALOMA et al., 2009) foram retirados de um camundongo não relacionado, e fixados em paraformaldeído 4% por 20 minutos. As amostras foram emblocadas em OCT Tissue Tek (Sakura) e os cortes foram realizados em criostato Leica CM1850 com espessura de 7 µm. Para bloquear os radicais aldeídicos, glicina 0,1M foi usada por 2 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados 5 vezes com PBS pH7,4. Para bloquear os sítios inespecíficos, foi utilizada uma solução de PBS caseína 2% e para promover a permeabilização do tecido foi utilizado 0,1% de Triton x-100 incubados por 30 minutos. Os anticorpos murinos foram incubados na diluição 1:50 em PBS 1x e caseína 2% por 2 horas. Os anticorpos não ligados foram retirados mediante 3 lavagens com PBS pH7,4. O anticorpo anti-IgG de camundongo secundário marcado (Alexa fluor 488), produzido em cabra (Invitrogen) foi incubado por 1 hora no escuro. Para marcação nuclear, foi utilizado 10µM de DAPI (Invitrogen) por 5 minutos.

As lâminas foram montadas com 20 µL de fluoromount (1:2) e analisadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a significância foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey que foi utilizado para comparar os grupos. A significância da diferença na frequência dos cisticercos em estádios inicial, larval ou final entre os três grupos foi determinada pelo teste do qui-quadrado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado para indicar diferença significativa estatisticamente.

4. RESULTADOS

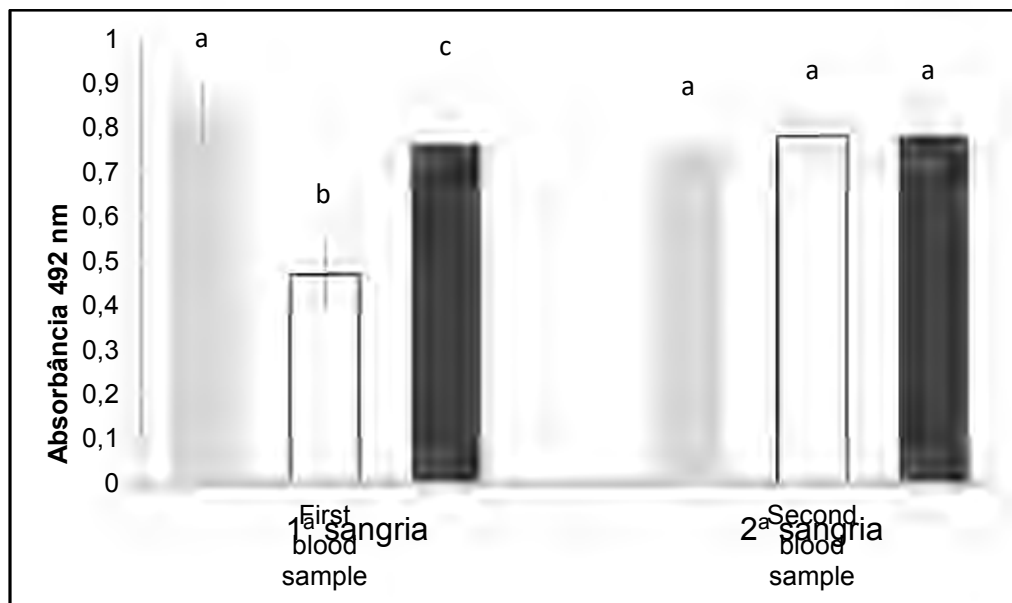
4.1 TÍTULOS DE ANTICORPOS SÉRICOS

Amostras de soro foram obtidas após a terceira e oitava imunização e a imunogenicidade dos imunógenos (NC-1 acoplado ao BSA, antígeno bruto de *T. crassiceps* (TcCa) e somente o BSA) foi comparada.

Por ELISA, observa-se a presença de anticorpos nos três grupos, contudo, na primeira sangria os títulos de anticorpos do grupo imunizado com antígeno bruto foram menores quando comparado com outros dois grupos. Com o emprego do teste ANOVA (análise de variância), a diferença dos títulos foi significativa entre os três grupos ($p < 0,05$) (gráfico 9).

Entretanto, o teste de Tukey mostrou que, após a oitava imunização, os títulos médios de anticorpos de grupos de camundongos eram iguais (gráfico 9). Desse modo, os resultados indicam que no momento do desafio, os camundongos dos três grupos estavam igualmente imunizados.

GRÁFICO 9 – REATIVIDADE DOS SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM PEPTÍDEO NC-1 ACOPLADO AO BSA, ANTÍGENO BRUTO E BSA.



Reatividade dos soros de camundongos imunizados com peptídeo NC-1 acoplado ao BSA (□), antígeno bruto de *T. crassiceps* -TcCa (■) e BSA (■). As diferenças individuais entre os grupos de soro foram determinadas por ANOVA e pelo teste de Tukey. Os títulos de anticorpos das amostras de sangue da primeira sangria não foram semelhantes ($p < 0,05$) e os resultados são representados por letras minúsculas diferentes (a, b, c). Já na segunda sangria, não houve diferença significativa entre as amostras, sugerindo que os grupos estavam igualmente imunizados. O resultado é ilustrado por letras iguais.

4.2 PROTEÇÃO INDUZIDA POR NC-1

Nos camundongos imunizados com o NC-1 acoplado ao BSA, observou-se uma diminuição da carga parasitária em 74,2%, quando comparado ao grupo controle (TABELA 11). O grupo imunizado com TcCa teve proteção de 77%.

Para a análise estatística, os valores dos cisticercos recuperados foram transformados pela equação $\sqrt{x + 0,5}$. Considerando a média do número de cisticercos de cada grupo, foi possível verificar que os animais imunizados com o peptídeo NC-1 acoplado ao BSA ou com TcCa apresentaram índices similares de proteção. Por outro lado, ambos os grupos foram significativamente diferentes do grupo controle imunizado somente com BSA ($p = 0,0113$).

TABELA 11 – PROTEÇÃO INDUZIDA POR NC-1 CONTRA INFECÇÃO POR CISTICERCOS DE *T. crassiceps*.

Imunógeno	Número de cisticercos recuperados*	Média ± DP	Proteção (%)
por camundongo			
NC-1/BSA	1, 243, 0, 91, 60, 14, 0	58.4 ± 87.6	74.2%
TcCa	143, 38, 0, 38, 134, 0, 0	50.4 ± 64.1	77.7%
BSA	361, 327, 293, 34, 156, 341, 135, 164	226.4 ± 119.5	-

*Cisticercos recuperados 30 dias após o desafio. Análise por ANOVA indica que a proteção induzida por NC-1 acoplado ao BSA e pelo antígeno bruto de *T. crassiceps* (TcCa) foi semelhante, porém diferentes estatisticamente do grupo controle imunizado somente com BSA.

4.3 INFLUÊNCIA DA IMUNIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS CISTICERCOS

Após a contagem total de cisticercos recuperados do peritônio dos camundongos, os cistos foram classificados de acordo com o comprimento ou diâmetro (FIGURA 12) e estágio de desenvolvimento (FIGURA 13).

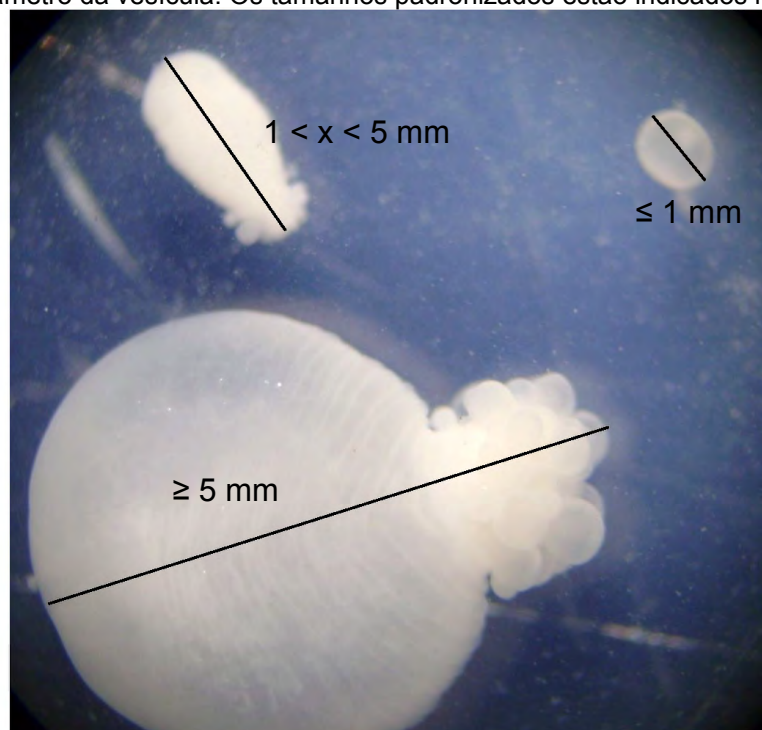
Pelo teste do qui-quadrado, pode-se verificar que o estágio de desenvolvimento dos cisticercos recuperados do grupo imunizado com o peptídeo NC-1 acoplado ao BSA, teve diferença significativa quando comparados aos cisticercos recuperados do grupo controle ($p < 0,0001$, qui-quadrado = 58) (TABELA 12). A falta de proteção imunológica permitiu que um elevado número de cisticercos pudesse se desenvolver, especialmente na fase larval, fase considerada reprodutiva.

Como esperado, o estágio de desenvolvimento dos cisticercos recuperados do grupo imunizado com TcCa também foi diferente do grupo controle ($p < 0,0001$, qui-quadrado = 16).

Embora o grupo NC-1/BSA tivesse um número menor de cisticercos na fase inicial quando comparados ao grupo controle, ele foi menos eficaz que o TcCa, no que diz respeito ao estágio inicial.

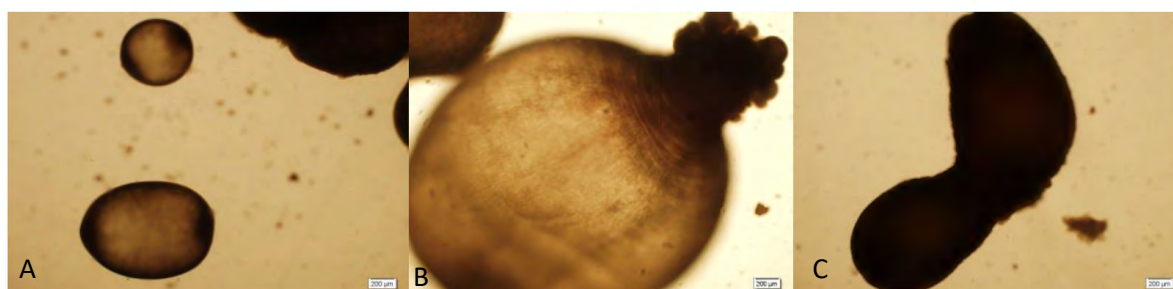
Considerando a grande variação nos tamanhos dos parasitos, eles foram separados em três grupos (≤ 1 mm, $1 < x < 5$ mm e ≥ 5 mm). O NC-1/BSA e o TcCa foram capazes de induzir resistência aos camundongos (gráfico 10) que apresentaram parasitos muito menores quando comparados ao grupo imunizado com BSA (controle).

FIGURA 12 – Os cisticercos recuperados foram classificados de acordo com o comprimento ou diâmetro da vesícula. Os tamanhos padronizados estão indicados na figura.



Fonte: Autor, 2011.

FIGURA 13 – Os cisticercos recuperados foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. A – fase inicial; B – fase larval ou de reprodução. As pequenas esferas localizadas acima do parasito são novos indivíduos, desenvolvidos por brotamento; C – fase final ou de morte.

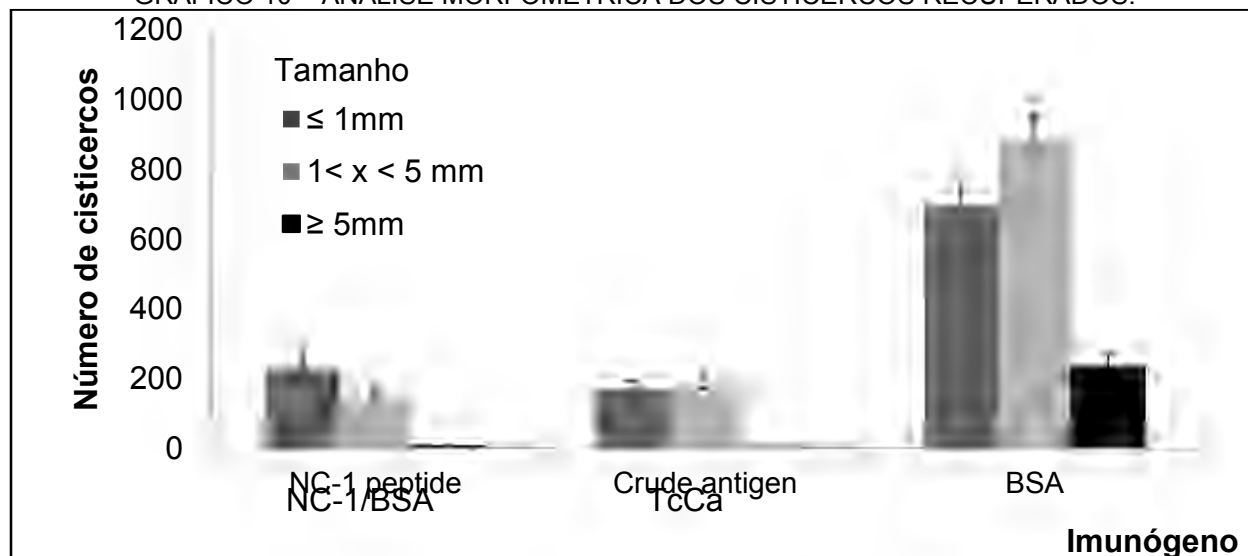


Fonte: Autor, 2011.

TABELA 12 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CISTICERCOS RECUPERADOS.

Imunógeno	(n)	Média ± DP	Estádio dos cisticercos (%)		
			Inicial	Larval	Final
NC-1/BSA	7	1.83 ± 1.04	225	154	0
TcCa	7	2.02 ± 1.03	175	178	0
BSA	8	2.49 ± 1.34	690	1120	1

GRÁFICO 10 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CISTICERCOS RECUPERADOS.



Efeito de proteção de NC-1 e do antígeno bruto de *T. crassiceps* (TcCa) em camundongos imunizados. Sete dias após a última imunização, os animais foram desafiados intraperitonealmente com 5 cisticercos em fase larval. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e os cisticercos recuperados.

4.4 IMUNOMARCAÇÃO EM CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*.

Soros dos camundongos imunizados com o peptídeo sintético NC-1 acoplado ao BSA, TcCa e BSA foram empregados num ensaio de imunofluorescência indireta em proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* em fase larval e final.

A técnica de imunofluorescência e análise das imagens para detecção dos anticorpos anti-NC-1/BSA sobre a fase larval mostraram que a proteína(s) reativa(s) estava(m) no tegumento e levemente no parênquima do cisticerco (FIGURAS 14 – I). Já no estágio final, os anticorpos marcaram fortemente o parênquima (FIGURAS 15 – I).

A mesma reatividade não foi observada em relação ao padrão de imunofluorescência dos anticorpos anti-TcCa (FIGURAS 14 e 15 – H).

Como esperado, nenhuma reatividade foi detectada nas secções incubadas com anticorpos anti-BSA, utilizados como controle negativo (FIGURAS 14 e 15 – G).

FIGURA 14 – Imunofluorescência em cisticercos de *Taenia crassiceps* em estágio larval. Secções de 7µm foram processadas e incubadas com anticorpos dos camundongos imunizados com NC-1 acoplado ao BSA, antígeno bruto de *T. crassiceps* e BSA (controle). A-C: contraste de fase (DIC); D-F: marcação dos núcleos com DAPI; G-H: Alexa 488. A, D, G: anticorpos anti-BSA; B, E, H: anticorpos anti-*T. crassiceps*; C, F, I: anticorpos anti-NC-1.

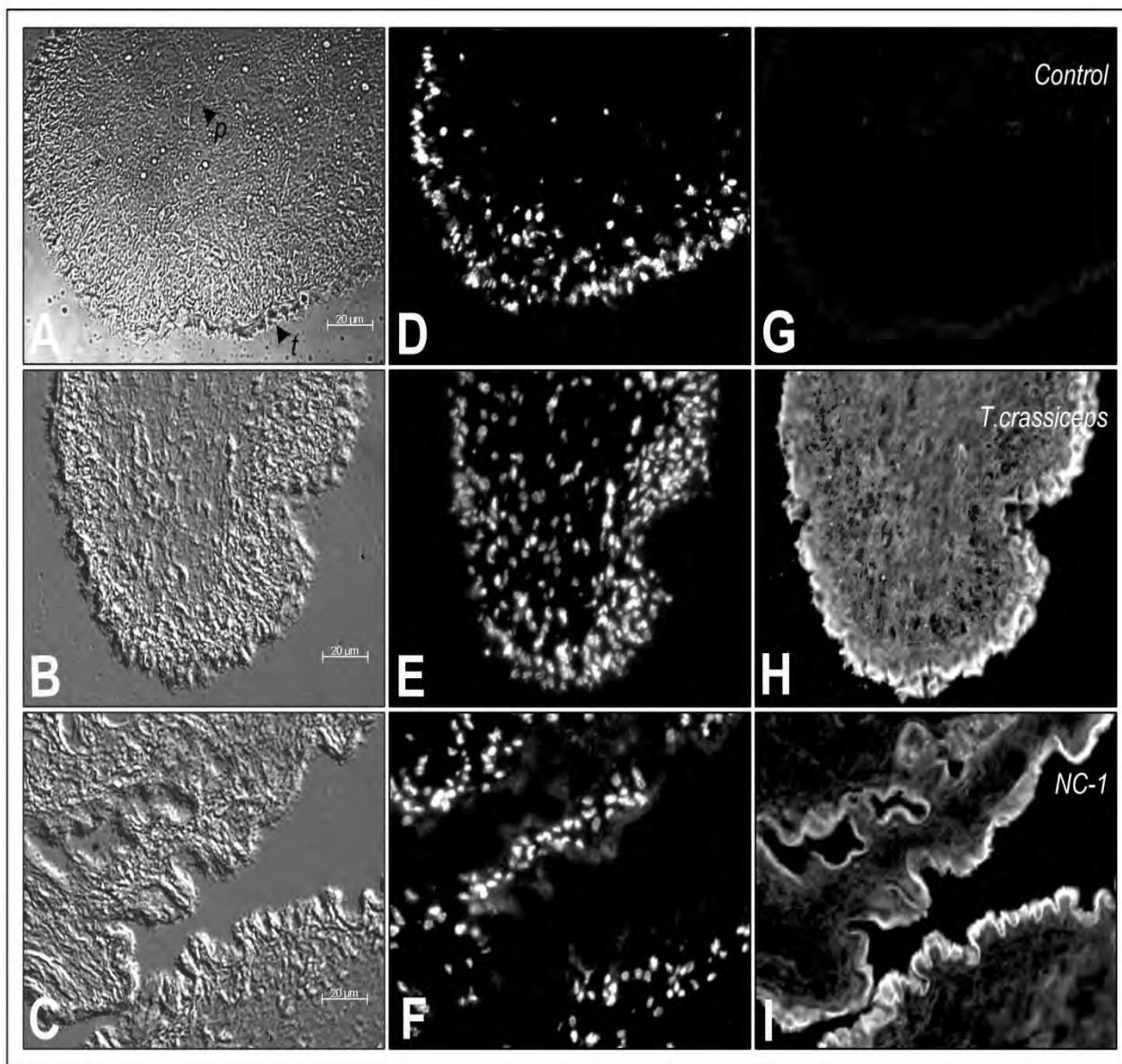
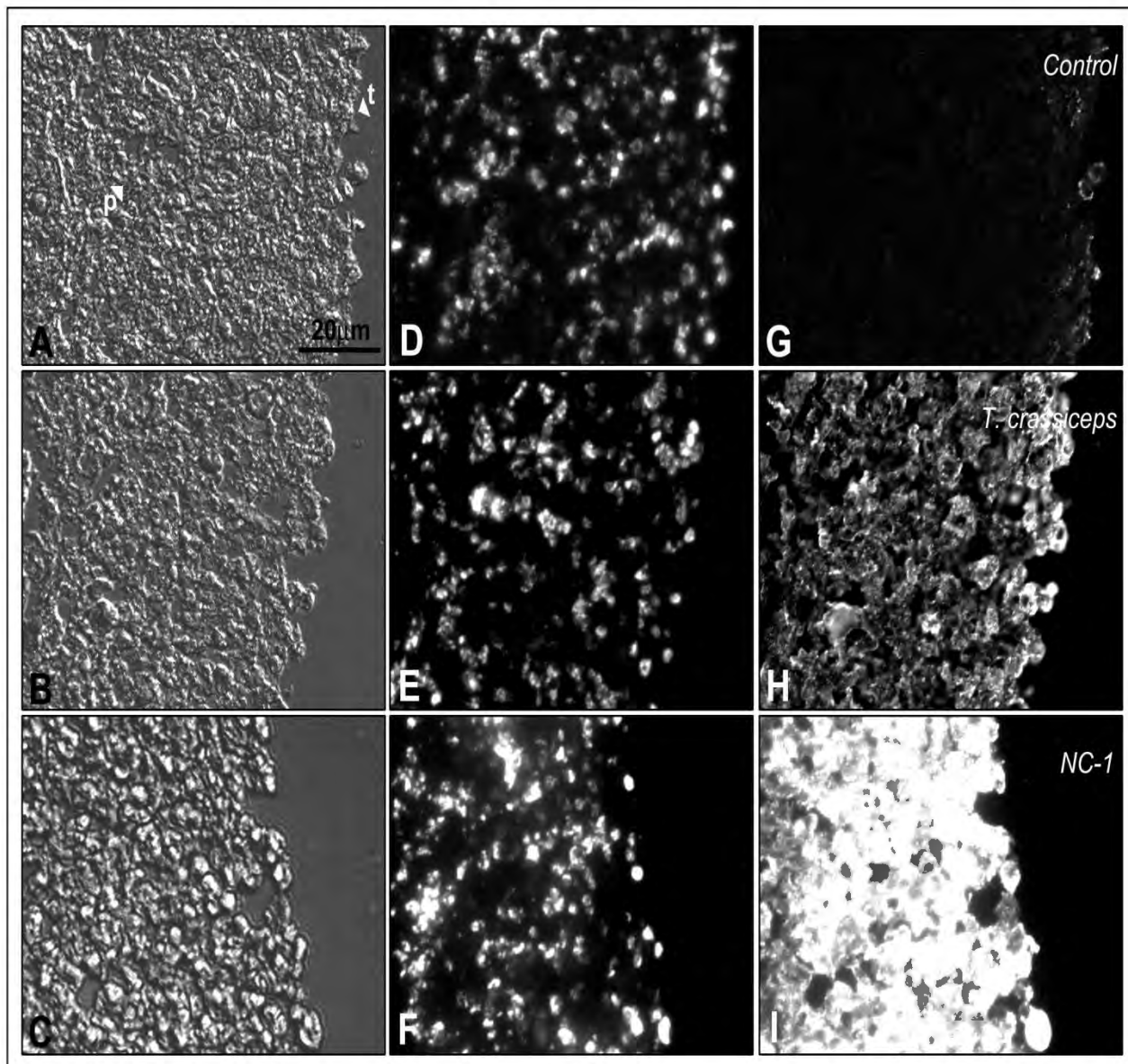


FIGURA 15 – Imunofluorescência em cisticercos de *Taenia crassiceps* em estágio final. Seções de 7µm foram processadas e incubadas com anticorpos dos camundongos imunizados com NC-1 acoplado ao BSA, antígeno bruto de *T. crassiceps* e BSA (controle). A-C: contraste de fase (DIC); D-F: marcação dos núcleos com DAPI; G-H: Alexa 488. A, D, G: anticorpos anti-BSA; B, E, H: anticorpos anti-*T. crassiceps*; C, F, I: anticorpos anti-NC-1.



5. DISCUSSÃO

A escolha pelo teste de um peptídeo obtido por anticorpos anti-*T. solium* em camundongos, que podem albergar o estágio larval de *T. crassiceps*, se justifica pela reação cruzada que existe entre os parasitos e também pelo fato do metacestódeo de *T. crassiceps* ter seu ciclo biológico bem adaptado em laboratório, tornando possível sua multiplicação em camundongos. Ainda, o soro de animais imunizados com cisticercos de *T. crassiceps* reconhece proteínas de cisticercos de *T. solium* e vice-versa, sugerindo que os dois antígenos possuem epitopos antigênicos semelhantes (MINOZZO et al., 2004).

Estudos mostram que o peptídeo sintético NC-1 pode ser usado como antígeno em testes imunoenzimáticos porque é capaz de detectar pacientes portadores de neurocisticercose (HELL et al., 2009). Anticorpos murinos anti-NC-1 reconheceram quatro isoformas de ~45kDa em um 2D SDS-PAGE, e imunolocalizaram regiões específicas localizada abaixo dos ganchos do escólex de cisticercos de *T. solium*.

A possibilidade de uso de peptídeos selecionados por *Phage Display* através da neutralização ou seu uso como moléculas protetoras é baseado no fato de que as sequências de aminoácidos podem ser idênticas (MURTHY et al., 1998; CHOULIER et al., 2001) ou de apresentarem características físico-químicas ou organização espacial muito semelhantes que o antígeno original (ADDA et al., 1999; FORSTER-WALDL et al., 2005), e conseqüentemente ser capaz de induzir uma resposta imunoprotetora.

Com base em diversos estudos anteriores que investigam a capacidade protetora de peptídeos obtidos por *Phage Display*, tem-se que podem atuar contra o câncer (FAHAM; ALTIN, 2010), toxinas (SUTHERLAND; MAYNARD, 2009), bactérias (WANG et al., 2007) vírus (CHEN et al., 2001), fungos (DATTA et al., 2008), ecto (PRUDÊNCIO et al., 2010) e endoparasitas (WU et al., 2006).

Comparando os animais que receberam exclusivamente BSA como imunógeno, NC-1/BSA foi capaz de induzir uma diminuição significativa da parasitemia. Numericamente, esta proteção não foi significativamente diferente do grupo imunizado com antígeno bruto de *T. crassiceps* (TcCa). Contudo, nossos resultados estatísticos indicam que NC-1/BSA foi menos eficiente que TcCa no estágio inicial dos parasitos.

Este resultado não foi completamente inesperado, tendo em vista que o NC-1 representa apenas um peptídeo, enquanto o TcCa é uma miscelânea de proteínas imunogênicas.

A mesma explicação poderia ser dada para explicar a reatividade da imunomarcção da fase larval, onde os anticorpos murinos anti-TcCa marcaram parênquima e tegumento, enquanto que os anti-NC-1/BSA marcaram principalmente a superfície do tegumento. Esta localização no tegumento de *Taenia* sp. favorece o seu reconhecimento pelo soro do paciente (HELL et al. 2009) sugerindo que o peptídeo pode ser testado no diagnóstico a cisticercose suína e bovina provocada por cisticercos de *T. solium* e *T. saginata*, respectivamente. Já a imunoreatividade observada pela marcação dos anticorpos anti-NC-1/BSA na fase final, sugere que a proteína reconhecida é super expressada durante o processo de morte celular programada (PRESAS et al. 2005). Contudo, mais estudos sobre a proteômica de *T. crassiceps* são necessários para determinar a importância destas proteínas na imunoproteção da cisticercose.

Ainda, a imunoreatividade dos soros de camundongos imunizados com NC-1/BSA na superfície do tegumento do cisticercos indica que aquelas proteínas podem ser importantes candidatos vacinais.

A resposta humoral tem mostrado ser crucial em alguns casos de infecção por cestódeos. Numa infecção por *Taenia hydatigena*, os anticorpos do hospedeiro foram capazes de proteger outros animais que receberam uma transferência passiva de soro imune (JACOBS et al. 1994). Estudos também sugerem que a alta capacidade de proteção do soro imune contra uma proteína recombinante de *T. solium*, a TSOL 18, está relacionada com atividades mediadas pelo sistema complemento (KYNGDOM et al. 2006).

A maioria dos peptídeos selecionados por *Phage Display* tem a característica de serem epitopos conformacionais e os dados de Hell e colaboradores (2009) indicam que o NC-1 é um peptídeo que depende da conformação para ligação com anticorpos específicos. Curiosamente, a proteína recombinante TSOL 18, bem como a EG95, um antígeno vacinal importante contra hidatidose, também são capazes de induzir anticorpos que reconhecem epitopos conformacionais. Outros estudos devem ser realizados, mas é possível que a eficiência da proteção contra os parasitos seja influenciada pela conformação, ao invés de determinantes lineares.

Os resultados apresentados por nosso grupo sugerem que, mesmo sem a prevenção total da carga parasitária, NC-1 revelou-se um importante marcador para o desenvolvimento de vacinas e ainda que uma boa resposta imunológica protetora pode ser induzida por um peptídeo sintético.

6. ARTIGO

Vaccine 29 (2011) 9473–9479



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis

Janaína Capelli-Peixoto^{a,b}, Carlos Chávez-Olórtegui^c, Daniele Chaves-Moreira^d,
João Carlos Minozzo^e, Juarez Gabardo^f, Kádima Nayara Teixeira^c, Vanete Thomaz-Soccol^{b,g},
Larissa Magalhães Alvarenga^{a,b,g}, Juliana de Moura^{a,g,*}

^a Departamento de Patologia Básica, UFPR, Curitiba - PR, Brazil

^b Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, UFPR, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte - MG, Brazil

^d Departamento de Biologia Celular, UFPR, Curitiba - PR, Brazil

^e Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos, SESA-PR, Piraquara - PR, Brazil

^f Departamento de Genética, UFPR, Curitiba - PR, Brazil

^g Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, UFPR, Curitiba - PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2011

Received in revised form 6 October 2011

Accepted 10 October 2011

Available online 24 October 2011

Keywords:

Mimotope

Synthetic peptide

Immunoprotection

Taenia solium

Taenia crassiceps

Cysticercosis

ABSTRACT

An NC-1 mimotope from *Taenia solium* cysticerci can help identify patients with neurocysticercosis through immunoassay. After chemical synthesis, an NC-1 peptide was coupled to bovine serum albumin (NC-1/BSA) for used as an immunogen in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis, which is an experimental model of cysticercosis caused by *T. solium*. NC-1/BSA immunisation decreased parasitaemia by inducing 74% protection compared to the 77% protection obtained with *T. crassiceps* crude antigen. The influence of immunisation was also observed on the size and stage of development of the parasite. Antibodies from NC-1/BSA-immunised mice recognised proteins from the tegument and from the buddings, and intense immunostaining was observed in the final stage of the metacystode. The capacity of NC-1/BSA to induce protective antibodies which are reactive to proteins from the tegument of the metacystode suggests that this mimotope is a potential candidate for a vaccine against human and animal cysticercosis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os resultados referentes aos capítulos 1 e 2 demonstram que a tecnologia de *Phage Display* é eficiente na seleção e identificação de peptídeos reativos à anticorpos de interesse, bem como na imunoproteção de camundongos contra infecção experimental por *Taenia crassiceps*.

Nossos resultados nos encorajam a continuar a pesquisa, porque mostraram-se promissores no sentido de sua utilização em outros experimentos que envolvam bovinos e suínos.

8. REFERENCIAS

ABUNNA, F.; TILAHUN, G.; MEGERSA, B.; REGASSA, A.; KUMSA, B. Bovine Cysticercosis in Cattle Slaughtered at Awassa Municipal Abattoir, Ethiopia: Prevalence, Cyst Viability, Distribution and its Public Health Implication. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 2, p. 82-88, 2008.

ABIPECS. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br/>>. Acessado em: novembro de 2010.

ABUSEIR, S.; KUHNE, M.; SCHNEIDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p.131-137, 2007.

ABUSEIR, S.; NAGEL-KOHL, U.; PROBST, D.; KÜHNE, M.; EPE, C.; DOHERR, M. G.; SCHNIEDER, T. Seroprevalence of *Taenia saginata* cysticercosis in the federal state of Lower Saxony in Germany. **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 123, n. 9-10, p. 392-396, 2010.

ADDA, C. G.; TILLEY, L.; ANDERS, R. F.; FOLEY, M. Isolation of peptides that mimic epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4679-4688, set. 1999.

ALLEPUZ, A.; NAPP, S.; PICADO, A.; ALBA, A.; PANADES, J.; DOMINGO, M.; CASAL, J. Descriptive and spatial epidemiology of bovine cysticercosis in North-Eastern Spain (Catalonia). **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 43-48, 2009.

ALMEIDA, D. O.; IGREJA, H. P.; ALVES, F. M. X.; SANTOS, I. F.; TORTELLY, R. Cisticercose bovina em matadouro-frigorífico sob inspeção sanitária no município de Teixeira de Freitas-BA: prevalência da enfermidade e análise anatomopatológica de diagnósticos sugestivos de cisticercose. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 178-182, set./dez. 2006.

ALVARENGA, L. M.; DINIZ, C. R.; GRANIER, C.; OLÓRTEGUI, C. C. Induction Of neutralizing antibodies against Tityus Serrulatus scorpion toxins by Immunization with defined synthetic epitopes. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 89-95, 2002.

ALVES, T. A. G. Prevalência da cisticercose em bovinos e suínos no município de camboriú, Lages-SC: Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, 2000.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Affinity chromatography. Principles and methods. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, 1993.

ASAAVA, L. L.; KITALA, P. M.; GATHURA, P. B.; NANYINGI, M. O.; MUCHEMI, G.; SCHELLING, E. A survey of bovine cysticercosis/human taeniosis in Northern Turkana District, Kenya. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, n. 3-4, p. 197-204, 2009.

ARAP, M.A. Phage Display technology – Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, mar. 2005.

BARCELOS, I. S. C.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of the paired samples (cerebrospinal fluid and serum) in immunodiagnostic of active and inactive human neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, jul. 2005.

BARROS, C.; RISSI, D.; RECH, R. Reconhecimento, interpretação e destino de lesões de bovinos em abatedouros. Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário – ENDIVET. 2008.

BEEFPOINT. Disponível em:
<<http://www.beefpoint.com.br/?noticialID=49846&actA=7&areaID=15&secaoID=166>>
Acessado em: 2008/2009/2010.

BLANK, M.; SHOENFELD, Y.; CABILLY, S.; HELDMAN, Y.; FRIDKIN, M.; KATCHALSKI-KATZIR, E. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by syntetic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 5164-5168, abril 1999.

BOBES, R. J.; FRAGOSO, G.; REYES-MONTES, M. R.; DUARTE-ESCALANTE, E.; VEJA, R.; DE ALUJA, A. S.; ZÚÑIGA, G.; MORALES, J.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 130-135, fev. 2010.

BONNYCASTLE, L. L. C.; MEHROKE, J. S.; RASHED, M.; GONG, X.; SCOTT, J. K. Probing the Basis of Antibody Reactivity with a Panel of Constrained Peptide Libraries Displayed by Filamentous Phage. **Journal of Molecular Biology**, v. 258, n. 5, p. 747-762, maio 1996.

BRADBURY, A. R. The use of phage display in neurobiology. **Current Protocol in Neuroscience**, vol. 5, n. 12, abril 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Rio de Janeiro. 1952.

BROWN, G.; DENNIS, M. M.; SLAPETA, J.; THOMPSON, A. R. Prevalence of *Cysticercus bovis* (beef measles) in Australian cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 12, p. 463-464, dez. 2010.

BROTTO, W. Aspectos neurológicos da cisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 5, p. 258-294, 1947.

CADMUS, S. I.; ADESOKAN, H. K. Causes and implications of bovine organs/offal condemnations in some abattoirs in Western Nigeria. **Tropical Animal Health Production**, v. 41, n. 7, p. 1455-1463, out. 2009.

CARRADA-BRAVO, T. Teniasis-cisticercosis como problema de salud pública. **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, v. 44, n. 7, 1987.

CASTELLANOS-SÁNCHEZ, V. O.; GÓMEZ-CONDE, E.; ROCHA-GRACIA, R. C.; PIMENTEL, A.; ALUJA, A.; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, P.; HUERTA, M.; DÍAZ-OREA, M.A. Chorionic gonadotropin hormone receptors on *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci in culture. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 6, p. 1287-1294, dez. 2009.

CHEN, X.; SCALA, G.; QUINTO, I.; LIU, W.; CHUN, T. W.; JUSTEMENT, J. S.; COHEN, O. J.; VANCOTT, T. C.; IWANICKI, M.; LEWIS, M. G.; GREENHOUSE, J.; BARRY, T.; VENZON, D.; FAUCI, A. S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. **Nature Medicine**, v. 7, n. 11, p. 1225-1231, nov. 2001.

CHIESA, F.; DALMASSO, A.; BELLIO, A.; MARTINETTI, M.; GILI, S.; CIVERA, T. Development of a biomolecular assay for postmortem diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1171-1175, out. 2010.

CHOULIER, L.; LAUNE, D.; ORFANOUDAKIS, G.; WLAD, H.; JANSON, J.; GRANIER, C.; ALTSCHUH, D. Delineation of a linear epitope by multiple peptide synthesis and phage display. **The Journal of Immunological Methods**, v. 249, n. 1-2, p. 253-264, mar. 2001.

CORRÊA, G. L. B.; ADAMS, N. A.; ANGNES, F. A.; GRIGOLETTO, D. S. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em Santo Antônio das Missões, RS, Brasil. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 4, n. 1, p. 77-80, 1997.

CORTEZ ALCOBEDES, M. M., BOGGIO, G., GUERRA MDE, L., DE GAVIDIA, M. R., ROJAS REYES, G. C., FERRER, E., LARES, M., ALVIAEZ, Y., HARRISON, L. J., PARKHOUSE, R. M. Evidence that active transmission of porcine cysticercosis occurs in Venezuela. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 3, p. 531-537, mar. 2010.

DATTA, K.; LEES, A.; PIROFSKI, L. A. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol. 15, n. 8, p. 1176-1187, ago. 2008.

DEL BRUTTO, O. H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE, A.C., JR.; TSANG, V.C.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O. M.; SCHANTZ, P. M.; EVANS, C. A.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J. C.; SARTI, E.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, vol. 57, n. 2, p. 177-183, jul. 2001.

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT J.; VANSTEENKISTE W.; BERKVEN S. D.; GEERTS S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 1-2, p. 43-49, fev. 2000.

DORNY, P.; PHIRI, I.; GABRIEL, S.; SPEYBROECK, N., VERCRUYSSSE, J. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 3, p. 211-215, mar. 2002.

DRAELANTS, E.; BRANDT, J. R. A.; KUMAR, V.; GEERTS, S. Characterization of epitopes on excretory-secretory antigens of *Taenia saginata* metacestodes recognized by monoclonal antibodies with immunodiagnostic potential. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 119-126, 1995.

EMBRAPA. Disponível em:
<<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2003/maio/bn.20041125.0954651307/?searchterm=rastreabilidade>> Acessado em: maio de 2009.

FAHAM, A.; ALTIN, J. G. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. **Journal of Immunology**, vol. 185, n. 3, p. 1744-1754, ago. 2010.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSEKBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, jul. 2005.

FERNANDES, J. O. M.; BUZETTI, W. A. S. Prevalência de cisticercose bovina em animais abatidos em frigoríficos sob inspeção federal, da 9ª região administrativa de Araçatuba. **Higiene alimentar**, v. 12, n. 4, 2001.

FERNANDES, J. O. M.; SILVA, C. L. S. P.; BORGES, J. H. R.; PEGAIANE, J. C.; COELHO, R. V. Prevalência da cisticercose bovina em animais abatidos em estabelecimento sob regime de inspeção federal no município de Andradina – SP. *Revista Ciências Agrárias e da Saúde*, v. 2, n. 1, p. 14-17, 2002.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L. W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; GARATE, T.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83-94, jan. 2003.

FERRER, E.; GONZÁLEZ, L. M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J. A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M. E.; CORTÉZ, M. M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 517-525, ago. 2007.

FIGUEIRA, S. R.; MIRANDA, S. H. G. Impactos da implantação da rastreabilidade no sistema agroindustrial da carne bovina – Estudo de caso sobre um frigorífico exportador. In: XLIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2006: Fortaleza: **Anais...**Fortaleza, 2006. CD-ROOM.

FISCHER P. M.; HOWDEN M. E. H. Synthetic peptide antigens of tetanus toxin. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 15, p. 1141-1148, out. 1994.

FÖRSTER-WALDL, E.; RIEMER, A. B.; DEHOF, A. K.; NEUMANN, D.; BRÄMSWIG, K.; BOLTZ-NITULESCU, G.; PEHAMBERGER, H.; ZIELINSKI, C. C.; SCHEINER, O.; POLLAK, A.; LODE, H.; JENSEN-JAROLIM, E. Isolation and structural analysis of peptide mimotopes for the disialoganglioside GD2, a neuroblastoma tumor antigen. **Molecular Immunology**, vol. 42, n. 3, p. 319-325, fev. 2005.

FUMAGALLI, M. Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por Phage Display e Spot synthesis. 2008. **Dissertação de mestrado** em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

FLUTSCH, F.; HEINZMANN, D.; MATHIS, A.; HERTZBERG, H.; STEPHAN, R.; DEPLAZES, P. Case-control study to identify risk factors for bovine cysticercosis on farms in Switzerland. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 641-646, abril 2008.

FRANK, R. Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**, v. 48, n. 42, p. 9217-9232, 1992.

GARCÍA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; EVANS, C. A.; GILMAN, R. H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, vol. 362, n. 9383, p. 547–556, ago. 2003.

GANÇ, A. J.; CORTEZ, T. L.; VELOSO, P. P. A. A Carne suína e suas implicações no complexo teníase-cisticercose. p. 1-6, 2004.

GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. **Veterinary Science**, v. 30, n. 3, p. 288-293, maio 1981.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Molecular Immunology**, v. 23, n. 7, p. 709-715, jul. 1986.

GEYSEN, D.; KANOBANA, K.; VIVTOR, B.; RODRIGUEZ-HIDALGO, R.; DE BORCHGRAVE, J.; BRANDT, J. E.; DORNY, P. Validation of meat inspection results for

Taenia saginata cysticercosis by PCR-restriction fragment length polymorphism. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 236-240, jan. 2007.

GIROTTTO, A.; PINTO, P. S. A.; DIAS, J. C. O.; CHAVES, L. S.; FERREIRA, H. C. C. Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no *immunoblot*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1136-1140, 2008.

GONZALEZ, A. E.; CAMA, V.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. W.; PILCHER, J. B.; CHAVERA, A.; CASTRO, M.; MONTENEGRO, T.; VERASTEGUI, M.; MIRANDA, E.; BAZALAR, H. Prevalence and Comparison of Serologic Assays, Necropsy, and Tongue Examination for the Diagnosis of Porcine Cysticercosis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 43, n. 2, p. 194-199, 1990.

GONZALEZ, L. M.; MONTERO, E.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GARATE, T. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 737-744, fev. 2000.

GWEBE, M.; FALEKE, O. O.; JUNAIDU, A.; FABIYI, J. P.; FAJINMI, A. O. Some risk factors for *Taenia solium* cysticercosis in semi-intensively raised pigs in Zuru, Nigeria. **Veterinaria Italiana**, v. 46, n. 1, p. 57-67, jan./mar. 2010.

HAMBY, C. V. Use of peptide library screening to detect a previously unknown linear diagnosis epitope: proof of principle by use of Lyme disease sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 7, p. 801-807, jul. 2005.

HARIDY, F. M.; IBRAHIM, B. B.; MORSY, T. A.; RAMADAN, N. I. Human taeniasis and cysticercosis in slaughtered cattle, buffaloes and pigs in Egypt. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 375-394, ago. 1999.

HARLOW, E.; LANE, D. - **Antibodies: A Laboratory Manual**. 1988.

HAWK, M. W.; SHAHLAIE, K.; KIM, K. D.; THEIS, J. H. Neurocysticercosis: a review. **Surgical Neurological**, vol. 63, n. 2, p. 123-132, fev. 2005.

HELL, R. C. R.; AMIM, P.; ANDRADE, H. M.; AVILA, R. A. M.; FELICORI, L.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A. P.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 129-38, abril 2009.

HERNANDEZ, R.; GAZARIAN, T. G.; HÉRION, P. S.; GAZARIAN, K. G. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. **Immunology Letters**, vol. 80, n. 2, p. 97-103. 2002.

HUGHES, G.; HOQUE, M.; TEWES, M. S.; WRIGHT, S. H.; HARRISON, L. J. Seroepidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Swaziland. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n. 3, p. 287-291, nov.1993.

IASBIK, A. F.; PINTO, P. S. A.; BEVILACQUA, P. D.; NERO, L. A.; SANTOS, T. O.; FELIPPE, A. G. Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural do município de Viçosa, Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1664-1667, 2010.

JACOBS, H. J.; MORIARTY, K. M.; CHARLESTON, W. A.; HEATH, D. D. Resistance against *Taenia hydatigena* in sheep after passive transfer of serum or colostrum. **Parasite Immunology**, vol. 16, n. 7, p. 351-359, jul. 1994.

JANK, M. S. Organizações e estratégias nas exportações brasileiras de carnes. In: CARVALHO, F., VIEIRA, W. Mercosul: Agronegócios e Desenvolvimento Econômico. Viçosa: UFV, 1997.

JESUS, M. A. S. A. Internacionalização da Carne Bovina Brasileira Sob a Ótica do Empreendedorismo Internacional: Estudo de Caso. Universidade Católica de Santos – UNISANTOS. Mestrado em Gestão de Negócios. 2008.

KALAYCIOGLU, A. T.; RUSSELL, P. H.; HOWARD, C. R. Selection of mimotopes of Bovine Viral Diarrhea Virus using a solid-phase peptide library. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7081-7086, out. 2007.

KAGIRA, J. M.; MAINGI, N.; KANYARI, P. W.; GITHIGIA, S. M.; NGANGA, J. C.; GACHOHI, J. M. Seroprevalence of *Cysticercus cellulosae* and associated risk factors in free-range pigs in Kenya. **Journal of Helminthology**, v. 84, n. 4, p. 398-403, dez. 2010.

KEBEDE, N., Cysticercosis of slaughtered cattle in northwestern Ethiopia. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 522-526, dez. 2008.

KHANIKI, G. R. J.; RAEI, M.; KIA, E. B.; HAGHI MOTEVALLI, A.; SELSELEH, M. Prevalence of bovine cysticercosis in slaughtered cattle in Iran. **Tropical Animal Health Productio**, v. 42, n. 2, p.141-143, fev. 2010.

KIRSCH, M. I.; HÜLSEWEH, B.; NACKE, C.; RÜLKER, T.; SCHIRRMANN, T.; MARSCHALL, H.; HUST, M.; DÜBEL, S. Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV). **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 66, set. 2008.

KYNGDON, C. T.; GAUCI, C. G.; GONZALEZ, A. E.; FLISSER, A.; ZOLI, A.; READ, A. J. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. **Parasite Immunology**, vol. 28, n. 5, p. 191-199, maio 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, E. G.; BAE, Y. A.; JEONG, Y. T.; CHUNG, J. Y.; JE, E. Y.; KIM, S. H.; NA, B. K.; JU, J. W.; KIM, T. S.; MA, L.; CHO, S. Y.; KONG, Y. Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 131, n. 6, p. 867-879, dez. 2005.

LOPES, W. D. Z.; SANTOS, T. R.; SOARES, V. E.; NUNE, J. N.; MENDONÇA, R. P.; LIMA, R. C. A.; SAKAMOTO, C. A. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, G. P.; ALVIMAR, J. C. Preferential infection sites of *Cysticercus bovis* in cattle experimentally infected with *Taenia saginata* eggs. **Reserch in Veterinary Science**, v. 90, n. 1, p. 84-88, fev. 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, nov. 1951.

MAEDA, G. E., KYVSGAARD, N. C., NANSEN, P., BIZRGH, H. Distribution of *Taenia saginata* cysts by muscle group in naturally infected cattle in Tanzania. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 28, n. 2, p. 81-89, nov. 1996.

MANHOSO, F. F. R.; PRATA, L. F. Prevalência de cisticercose bovina na região oeste do Estado de São Paulo. Fonte: Higiene alimentar. 2004.

MARQUES, G. M.; BUZI, K. A.; GALINDO, L. A.; BALDINI, E. D.; BIONDI, G. F. Avaliação dos Registros de condenação por cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos da região centro oeste do Estado de São Paulo – 1996 a 2000. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 114-120, abril 2008.

McCOOL, C. J. Distribuition of *Cysticercus bovis* in lightly infected young cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, n. 5, p. 214-216, maio 1979.

MINOZZO, J. C. Teste de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) para imunodiagnóstico da cisticercose bovina. 1997. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Paraná.

MINOZZO, J. C.; GUSSO, R. L. F.; CASTRO, E. A.; LAGO, O.; THOMAZ-SOCCOL, V. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, 2002.

MINOZZO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGUI, C. C.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Teste Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra-*Cysticercus bovis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, jun 2004.

MINOZZO, J. C.; DE MOURA, J.; ALMEIDA, S. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. T. Crude antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci used as heterologous antigen in ELISA and in EITB for neurocysticercosis diagnosis of patients from Paraná - Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 51, n. 6, dez. 2008.

MIRANDA, S. H. G. Quantificação dos efeitos das barreiras não-tarifárias sobre as exportações brasileiras de carne bovina. 2001. **Tese de Doutorado** em Economia Aplicada – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”.

MKUPASI, E. M.; NGOWI H. A.; NONGA, H. E. Prevalence of extra-intestinal porcine helminth infections and assessment of sanitary conditions of pig slaughter slabs in Dar es Salaam city, Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 2, p. 417-423, fev. 2011.

MÖBIUS, G. Epidemiologic studies of *C. bovis* and *T. saginata* infections in eastern and western Germany. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 100, n. 3, 1, p. 10-14, mar. 1993.

MONTEIRO L. L.; PINTO, P. S. A.; DIAS, F. S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n.3-4, p. 260-263, nov. 2006.

MONTEIRO, L. L. Emprego de antígenos de larvas de *Taenia crassiceps* e *Taenia solium* em teste ELISA para diagnostico da cisticercose bovina. 2004. **Dissertação de Mestrado** em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

MONTEIRO, L. L.; PINTO, P. S. A.; SALCEDO, J. H. P.; ARAÚJO, J. V.; SANTOS, W. L. M.; CECON, P. R. Antígenos de larva de *Taenia solium* em ELISA para diagnóstico da cisticercose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, fev. 2007.

MORALES, J.; MARTÍNEZ, J. J.; ROSETTI, M.; FLEURY, A.; MAZA, V.; HERNANDEZ, M.; VILLALOBOS, N.; FRAGOSO, G.; DE ALUJA, A. S.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e284, set. 2008.

MULLEN, L. M.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; RYCROFT, A. N.; HENDERSON, B. Phage display in the study of infectious diseases. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 141-147, mar. 2006.

MURREL, K. D.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. Parasitic Organisms. **Advanced Meat Research**. 1986.

MURTHY, K. K.; SHEN, S. H.; BANVILLE, D. Epitope mapping of SHP-1 monoclonal antibodies using peptide Phage Display. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, n. 1, p. 69-74, jul. 1998.

NETO, F. I.; PIANETTI-FILHO, G.; ARAÚJO, R. N.; NASCIMENTO, E. Imunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semi-purified scolex antigens from *Taenia solium*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, abril 2007.

NEWTON, J.; DEUTSCHER, S. L. Phage peptide display: Review. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 185, n. 2, p. 145-163, fev. 2008.

NGOWI, H. A.; KASSUKU, A. A.; MAEDA, G. E. M. M.; BOA, E.; CARABIN, H.; WILLINGHAM, A. L. Risk factors for the prevalence of porcine cysticercosis in Mbulu District, Tanzania. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 4, p. 275-283, abril 2004.

NIETO, D. Historical notes on cysticercosis. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J. P.; LARRALDE, C. (ed). Cysticercosis-present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982.

OIE. Disponível em:
<www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.09.05_CYSTICERCOSIS.pdf>
Acessado em: novembro de 2008.

ONYANGO-ABUJE, J. A.; NGINYI, J. M.; RUGUTT, M. K.; WRIGHT, S. H.; LUMUMBA, P.; HUGHES, G.; HARRISON, L. J. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. **Veterinary Parasitological**, v. 64, n. 3, p. 177-185, set. 1996.

OGUNREMI, O.; MACDONALD, G.; GEERTS, S.; BRANDT, J. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis by immunohistochemical test on formalin-fixed and paraffin-embedded bovine lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 438-441, set. 2004.

OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 93-101, abril 2010.

ORYAN, A.; MOGHADDAR, N.; GAUR, S. N. *Taenia saginata* cysticercosis in cattle with special reference to its prevalence, pathogenesis, and economic implications in Fars Province of Iran. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 319-327, abril 1995.

OSTOA-SALOMA, P.; OSTOA-JACOBO, P.; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; BAZÚA, S.; LARRALDE, C. Budding of *Taenia crassiceps* Cysticerci *In Vitro* Is Promoted by Crowding in Addition to Hormonal, Stress, and Energy-Related Signals. **Journal of Biomedicine and Biotechnolog**, v. 2010, p. 510978, jan. 2010.

OSTOA-SALOMA, P.; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-JACOBO, P.; LARRALDE, C. Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Journal of Immunology Methods**, vol. 351, n. 1-2, p. 46-54, dez. 2009.

PARDINI, A. X.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. *Cysticercus* antigens in cerebrospinal fluid samples from patient with neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 39, n. 9, p. 3368-3372, set.2001.

PAWLOWSKI, Z.; SCHULTZ, M. G. Taeniasis and cysticercosis. **Advances in Parasitology**, v. 10, p. 269-343, 1972.

PEARSE, B. H.; TRAUB, R. J.; DAVIS, A.; COBBOLD, R.; VANDERLINDE, P. B. Prevalence of *Cysticercus bovis* in Australian cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 7, p. 260-262, jun. 2010.

PENHA, T. R.; KRÜGER, E. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AGOTTANI, J. V. B.; ITANO, F. H.; TROIANO, L. D. C.; BRODZINSKI, J. Production and characterization of monoclonal antibodies anti fragment Fc of bovine IgG. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, fev. 2010.

PERALTA, R. H.; ESPÍNDOLA, N. M.; PARDINI, A. X.; IHA, A. H.; MOURA, H.; BARR, J. R.; VAZ, A. J.; PERALTA, J. M. *Taenia crassiceps* cysticerci: characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, vol. 124, n. 3, p. 295-300, mar. 2010.

PEREIRA, M. A. V. C.; SCHWANZ, V. S.; BARBOSA, C. G. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, submetidos ao controle do serviço de inspeção federal (SIF-RJ), no período de 1997 a 2003. **Arquivos do Instituto Biológico** (São Paulo), v. 73, n. 1, p.83-87, jan./mar., 2006.

PHIRI, I. K.; DORNY, P.; GABRIEL, S.; WILLINGHAM, A. L.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSSE, J. The prevalence of porcine cysticercosis in Eastern and Southern provinces of Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 31-39, ago. 2002.

PINTO, P. S. A.; MONTEIRO, L. L.; MINOZZO, J. C. A influência de diferentes grupos de soros-controle no diagnóstico da cisticercose bovina pelo teste ELISA. **Revista Ceres**, v. 53, n. 309, 2006.

PONDJA, A.; NEVES, L.; MLANGWA, J.; AFONSO, S.; FAFETINE, J.; WILLINGHAM, A. L.; THAMSBORG, S. M.; JOHANSEN, M. V. Prevalence and risk factors of porcine cysticercosis in Angónia District, Mozambique. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e594, fev. 2010.

POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I.; BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 145-150, abril 1994.

PRAET, N.; KANOBANA, K.; KABWE, C.; MAKETA, V.; LUKANU, P.; LUTUMBA, P.; POLMAN, K.; MATONDO, P.; SPEYBROECK, N.; DORNY, P.; SUMBU, J. *Taenia solium*

cysticercosis in the Democratic Republic of Congo: how does pork trade affect the transmission of the parasite? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. e817, set. 2010.

PRESAS, A. M.; ROBERT, L.; JIMÉNEZ, J. A.; WILLMS, K. Apoptosis patterns in experimental *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* strobilae from golden hamsters. **Parasitology Research**, vol. 96, n. 1, p. 1-5, abril 2005.

PRUDENCIO, C. R.; MARRA, A. O.; CARDOSO, R.; GOULART, L. R. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, vol. 172, n. 1-2, p.122-131, ago. 2010.

REY, L. Tênia e teníases. In: Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2008.

RIBEIRO, V. S. Identificação de peptídeos sintéticos ligantes à Imunoglobulinas G de pacientes com Neurocisticercose por Phage Display. 2009. **Dissertação de Mestrado** em Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia.

RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; CARDOSO, R.; VIEIRA, C. U.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v. 129, n. 2, p. 94-99, abril 2010.

RODRÍGUEZ-HIDALGO, R.; BENÍTEZ-ORTIZ, W.; DORNY, P.; GEERTS, S.; GEYSEN, D.; RON-ROMÁN, J.; PROAÑO-PÉREZ, F.; CHÁVEZ-LARREA, M. A.; BARRIONUEVO-SAMANIEGO, M.; CELI-ERAZO, M.; VIZCAÍNO-ORDÓÑEZ, L.; BRANDT, J. Taeniosis cysticercosis in man and animals in the Sierra of Northern Ecuador. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1-2, p. 51-60, dez. 2003.

ROMMEL, M.; ECKERT, J.; KUTZER, E.; KÖRTING, W.; SCHNIEDER, T. *Taenia saginata*. Zystizerkose. In: Veterinär medizinische Parasitologie Bary Buchverlag. 2000.

RUSSEL, M.; LINDEROTH, N. A.; SALI, A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. **Gene**, v. 192, n. 1, p. 23-32, jun. 1997.

SAKAI, H.; BARBOSA H. V.; SILVA, E. M.; SCHLABITZ, F. O.; NORONHA, R. P.; NONAKA, N.; FRANKE, C. R.; UENO, H. Short report: seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in Bahia State, northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 5-6, p. 268-269, maio/jun. 2001.

SANTIVÁÑEZ, S. J.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; CHILE, N.; OLEAGA, A.; ARANA, Y.; PALMA, S.; VERASTEGUI, M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R.; GARCIA, H. H.; SILES-LUCAS, M. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 1, p. 32–39, maio 2010.

SANTOS, A. S. Prevalência de cisticercose bovina em um frigorífico de inspeção federal do extremo sul da Bahia, no ano de 2007. 2008. **Trabalho monográfico de conclusão**

do curso de pós-graduação em higiene e inspeção de produtos de origem animal – Vigilância Sanitária da Universidade Castelo Branco.

SANTOS, J. P. Prevalência de cisticercose bovina em matadouro frigorífico sob inspeção estadual (SIE) em Santa Catarina. 2008. **Trabalho monográfico de conclusão do curso** de Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal – Vigilância Sanitária da Universidade Castelo Branco.

SARTI, E.; SCHANTZ, P. M.; PLANCARTE, A.; WILSON, M.; GUTIERREZ, I. O.; LOPEZ, A. S.; ROBERTS, J.; FLISSER, A. Prevalence and Risk Factors for *Taenia Solium* Taeniasis and Cysticercosis in Humans and Pigs in a Village in Morelos, Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 6, 1992.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J. P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *Taenia solium* disease rooted in developing countries and emerging as major health problem of global dimensions. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1875-1890, dez. 2000.

SCOTT J. K.; SMITH G. P. Searching for peptides ligands with an epitope library. **Science**, v. 249, n. 4967, p. 386-390, jul. 1990.

SECKA, A.; MARCOTTY, T.; DE DEKEN, R.; VAN MARCK, E.; GEERTS, S. Porcine cysticercosis and risk factors in the Gambia and Senegal. **Journal of Parasitology Research**, ago. 2010.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 2, p. 57-63, set. 2001.

SIG-SIF/MAPA. In Nordeste Rural. Disponível em<
<http://www.nordeste rural.com.br/redir.asp?instanceld=107&moduleObjld=3472&url=/nordeste rural/matler.asp%3Fnewsld%3D3472>> Acessado em: dezembro de 2010.

SILVA, M. C.; CORTEZ, A. A.; AQUINO-CORTEZ, A.; VALENTE, M.; TONIOLLI, R. Cisticercose suína, teníase e neurocisticercose humana no município de Barbalha, Ceará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 371-375, 2007.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, jun. 1985.

SOMPURAM, S. R.; KODELA, V.; RAMANATHAN, H.; WESCOTT, C.; RADCLIFFE, G.; BOGEN, S. A. Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality control targets. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 410–420, mar. 2002.

SOUZA, V. K.; PESSÔA-SILVA, M. C.; MINOZZO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Prevalência da cisticercose bovina no Estado do Paraná, sul do Brasil: avaliação de

26.465 bovinos inspecionados no SIF 1710. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 675, ago. 2007a.

SOUZA, V. K.; PESSÔA-SILVA, M. C.; KOWALCZUK, M.; MARTY, S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Regiões anatômicas de maior ocorrência de *Cysticercus bovis* em bovinos submetidos à inspeção federal em matadouro-frigorífico no município de São José dos Pinhais, Paraná, de julho a dezembro de 2000. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 92-96, abril/jun. 2007b.

SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, jun. 1985.

SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 3, p. 274-276, jun. 1991.

SUTHERLAND, J. N.; MAYNARD, J. A. Characterization of a key neutralizing epitope on pertussis toxin recognized by monoclonal antibody 1B7. **Biochemistry**, vol. 48, n. 50, p. 11982-11993, dez. 2009.

TEJADA, T. S.; DUVAL, L. H.; LANSINI, V.; VIDOR, A. C.; DUVAL, E. H. Prevalência de cisticercose nas diferentes regiões do estado do rio grande do sul. XIX CIC e XII ENPOS - II Mostra Científica. 2010.

TOLEDO, A.; LARRALDE, C.; FRAGOSO, G.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K.; HERNÁNDEZ, M.; ACERO, G.; ROSAS, G.; LÓPEZ-CASILLAS, F.; GARFIAS, C. K.; VÁZQUEZ, R.; TERRAZAS, I.; SCIUTTO, E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. **Infected Immunology**, vol. 67, n. 5, p. 2522-2530, maio 1999.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, V. K.; PESSOA, O. L.; MINOZZO, J. C.; PESSOA-SILVA, M. C.; PEIXOTO, R. P. M. G.; MOURA, J. F. Pesquisa de anticorpos contra *Cysticercus bovis*, por teste ELISA em bovinos de abatedouro. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, 2010.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 3, jun. 1992.

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M.; LIVRAMENTO, J. A.; DA SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 57, n. 3, p. 354-357, set. 1997.

VILLARD, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; KIEBER-EMMONS, T.; PIQUER, D.; GRAILLY, S.; BENHIDA, A.; KAVERI, S. V.; SAINT-REMY, J. M.; GRANIER, C. Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 949-52, ago. 2003.

VINAUD, M. C.; LINO, R. D. E. S. JR.; BEZERRA, J. C. *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. **Experimental Parasitology**, vol. 116, n. 4, p. 335-339, ago. 2007.

VOLLKOPFÝ, P.C.; XAVIER, M. M. B. B. S. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos sob inspeção sanitária em Campo Grande – MS. Disponível em: < <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1314-1.pdf> > Acessado em: dezembro de 2010.

WAIKAGUL, J.; DEKUMYOY, P.; ANANTAPHRUTI, M. T. Taeniasis, cysticercosis and echinococcosis in Thailand. **Parasitology International**, v. 55, p. S175-S180, 2006.

WALOCH, M. Cestode infections in Poland in 2008. **Przegląd epidemiologiczny**, v. 62, n. 2, p. 351-5, 2010.

WANDRA, T.; SUTISNA, P.; DHARMAWAN, N. S.; MARGONO, S.S.; SUDEWI, R.; SUROSO, T.; CRAIG, P. S.; ITO, A. High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002 -2004. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2006.

WANG, H.; GAO, Y.; GONG, Y.; CHEN, X.; LIU, C.; ZHOU, X.; BLACKALL, P. J.; ZHANG, P.; YANG, H. Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of *Avibacterium paragallinarum* from a phage display peptide library. **Veterinary Microbiology**, vol. 119, n. 2-4, p. 231-239, jan. 2007.

WANZALA, W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; KANG'ETHE, E. K. K. H.; ZESSIN, N. M. C.; KYULE, M. P. O.; OCHANDA, H.; HARRISON, L. J. S. Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. **African Health Sciences**, vol. 3, n. 2, p. 68-76, ago. 2003.

WU, H. W.; HU, X. M.; WANG, Y.; KURTIS, J. D.; ZENG, F. J.; MCGARVEY, S. T.; GUAN-WU, L.; ZHANG, Z. S.; HUA, Z. C. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. **Acta Tropica**, vol. 99, n. 2-3, p. 200-207, out. 2006.